

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GIOVANA TARDIN TORREZAN**

**FIBROADENOMAS MAMÁRIOS HUMANOS: EPIDEMIOLOGIA E ANÁLISE DA  
PERDA DE HETEROZIGOSE NA REGIÃO 3p**



**CURITIBA**

**2009**

GIOVANA TARDIN TORREZAN

**FIBROADENOMAS MAMÁRIOS HUMANOS: EPIDEMIOLOGIA E ANÁLISE DA  
PERDA DE HETEROZIGOSE NA REGIÃO 3p**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética,  
Departamento de Genética, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal  
do Paraná, para obtenção do título de  
Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de  
Souza Fonseca Ribeiro

CURITIBA

2009



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **GIOVANA TARDIN TORREZAN** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 20 de fevereiro de 2009

Professor Doutor Iglenir João Cavalli  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Professora Doutora Luciane Regina Cavalli – Univ. Georgetown, EUA  
Membro Titular (*ad hoc*)

Professora Doutora Giseli Klassen – Depto. Patologia Básica, UFPR  
Membro Titular

Professora Doutora Lupe Furtado Alle - UFPR  
Membro Suplente

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Centro Politécnico – Caixa Postal 19071 – CEP: 81531-990 – Curitiba, PR  
Telefone (41) 3361-1587 – Fax (41) 3361-1793 – ppg-gen@ufpr.br  
[www.genetica.ufpr.br](http://www.genetica.ufpr.br)

Você não pode evitar que a dificuldade bata  
à sua porta, mas não há necessidade de  
oferecer-lhe uma cadeira.

Joseph Joubert

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, obrigada pela dedicação, auxílio em todas as horas e confiança. Principalmente obrigada pelas lições de ética profissional e respeito que aprendi com vocês e por serem exemplos maravilhosos de pesquisadores e professores, por isso tenho a mais profunda admiração por vocês!

À minha banca de acompanhamento e de defesa, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Petzl-Erler, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Regina Cavalli, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lupe Furtado Alle. Obrigado pela disponibilidade, pelas sugestões e correções. A participação de vocês foi fundamental para a conclusão e qualidade deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pelo companheirismo, convivência e amizade. Em especial a Sarah, por compartilhar as dúvidas, angústias e dificuldades na elaboração de nossos trabalhos.

A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Genética por tudo que aprendi e pelos ótimos momentos de confraternização.

A todos os meus amigos e amigas, pela força em todos os momentos que precisei e pela amizade sincera.

Aos meus pais, Irineu e Iracema Torrezan, pelo incentivo e apoio incondicional, pelas oportunidades, por todo o amor e carinho e por serem exemplos de coragem, honestidade e perseverança. Ao meu irmão, Hugo, pelo carinho e amizade, e ao Márcio, por estar sempre ao meu lado, pela compreensão, paciência e apoio incondicional.

A todos os indivíduos e instituições envolvidos nesta pesquisa, sobretudo aos Drs. Rubens Lima e Cícero Urban, aos funcionários da Oncoclínica de Curitiba, do Hospital de Clínicas, Hospital Nossa Senhora das Graças, e à CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Fibroadenoma (FA) é o tipo mais frequente de lesão benigna da mama em mulheres de 15 a 30 anos de idade. A ocorrência desta lesão é um fator de risco para o câncer de mama, sendo que as suas características histológicas (complexidade e presença de hiperplasia) são importantes na determinação do risco de desenvolvimento do câncer. Acredita-se que a progressão de células normais a estágios hiperplásicos e neoplásicos seja causada por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. A perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 é uma alteração genética frequentemente observada em neoplasias e lesões pré-malignas mamárias, o que indica a existência nesta região de genes supressores de tumor envolvidos na tumorigênese mamária. Os objetivos deste trabalho foram realizar a análise epidemiológica de 141 fibroadenomas (FAs) mamários e determinar a frequência de perda de heterozigose (LOH) em 111 fibroadenomas mamários em sete marcadores de microssatélites na região 3p (D3S1274, D3S1079, D3S1300, D3S1581, D3S1286, D3S1263 e D3S1307). Os dados epidemiológicos das pacientes foram obtidos através da avaliação dos laudos histopatológicos e dos prontuários médicos. Para a análise de perda de heterozigose foram utilizadas amostras de sangue periférico e de tecido tumoral das pacientes. As análises de LOH foram realizadas através de amplificação por PCR com iniciadores fluorescentes e corrida eletroforética em sequenciador capilar *Megabace* 1000. A metaplasia apócrina foi a alteração mais frequentemente associada ao FA (22/141) e 26 (18,44%) casos de FA foram do tipo complexo, resultados estes semelhantes aos descritos na literatura. Em comparação com os FA simples, FA complexos apresentaram maior presença de hiperplasia ( $\chi^2_{(1)} \text{corr.} = 4,0$ ;  $p < 0,05$ ), maior média de idade das pacientes ( $t = 2,00$ ;  $p < 0,05$ ) e maior número de nódulos ( $Z(U) = 2,80$ ;  $p < 0,005$ ). Outras diferenças apresentadas entre essas lesões incluíram: apenas FAs simples apresentaram regressão do tamanho tumoral e diminuição do número de nódulos em função da idade e apenas FAs complexos demonstraram uma interdependência entre as variações do tamanho tumoral e do número de nódulos. Em relação à perda de heterozigose, foram observadas LOHs com baixa frequência nos sete locos analisados, variando de 4,0% para o marcador D3S1300 a 9,1% para o marcador D3S1079. No entanto, considerando a presença de LOH em pelo menos um dos marcadores, a frequência observada foi de 25,2%. As frequências de LOH e MOH (manutenção da heterozigose) distribuíram-se homogeneamente entre os marcadores ( $\chi^2_{(6)} = 1,67$ ;  $p = 0,95$ ). Nas comparações realizadas entre fibroadenomas e em carcinomas mamários, previamente analisados pelo nosso grupo para os mesmos marcadores de microssatélites, observou-se em todos os marcadores uma maior proporção de LOH estatisticamente significativa nos carcinomas ( $p$  variando de 0,0167 a  $< 0,0001$ ), inclusive na análise conjunta dos marcadores ( $\chi^2_{(1)} \text{corr.} = 29,46$ ;  $p < 0,0001$ ). A partir de nossos resultados, sugerimos que o procedimento terapêutico conservativo pode não ser apropriado para fibroadenomas complexos, considerando que estes tumores não apresentam tendência à regressão de tamanho como ocorre com os FAs simples. Concluímos também, através da baixa frequência de LOH observada nos casos analisados, que a LOH para marcadores na região 3p não é uma alteração de importância mais significativa na etiologia dos fibroadenomas mamários.

**Palavras-Chave:** Fibroadenoma. Epidemiologia. Perda de heterozigose. Braço curto do cromossomo 3.

## ABSTRACT

Fibroadenoma (FA) is the most frequent benign breast disease in young women (15 to 30 years). The occurrence of this lesion is a risk factor for subsequent breast cancer, and the risk is increased in women with complex fibroadenomas, proliferative disease, or a family history of breast cancer. The inactivation of tumor suppressor genes is an important event in carcinogenesis and often involves mutation of one allele and loss or replacement of a chromosomal segment containing the other allele. Loss of heterozygosity (LOH) involving polymorphic markers on the short arm of chromosome 3 is a frequent observed genetic alteration in breast carcinomas and precursor lesions. We performed epidemiological analysis in 141 fibroadenomas (FAs) and determined the frequency of LOH in 111 FAs in seven 3p microsatellite markers (D3S1274, D3S1079, D3S1300, D3S1581, D3S1286, D3S1263 e D3S1307). Peripheral blood DNA and tumor DNA were used to perform LOH analysis and the PCR reactions were performed with fluorescents labeled primers. Apocrine metaplasia was the most frequent histopathologic feature (22/141) found and 26 (18.44%) of fibroadenomas in this series were of the complex type. Complex fibroadenomas were seen more often in relatively older patients ( $t = 2.00$ ;  $p < 0.05$ ), were associated significantly with the presence of hyperplasia ( $\chi^2_{(1)} \text{corr.} = 4.0$ ;  $p < 0.05$ ) and had a higher number of nodules ( $Z(U) = 2.80$ ;  $p < 0.005$ ). Others significantly differences between simple and complex FAs were: only simple FAs decreased significantly in size and presented a lower number of nodules according to the patients age and only complex FAs had a interdependence association between tumor size and the number of nodules. For the microsatellites markers, in all loci analyzed we found a low frequency of LOH, varying from 4.0% for the marker D3S1300 to 9.1% for the marker D3S1079. The combining loci analysis showed a frequency of 25.2% of allelic loss in at least one locus, and the frequency of LOH was statistically higher in the carcinoma cases (previously analyzed in our group) than in the FAs cases ( $\chi^2_{(1)} \text{corr.} = 29.46$ ;  $p < 0.0001$ ). Our results suggest that conservative therapeutic approach may not be recommended for the management of patients with complex FAs, considering that these tumors do not regide in size according to the patients age. In addition, we concluded based on the low frequency of LOH observed in the cases analyzed, that LOH at markers at the 3p region is not an important change in the etiology of the mammary fibroadenomas.

**Keywords:** Fibroadenoma. Epidemiology. Loss of heterozygosity. 3p.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	Fatores que controlam o desenvolvimento mamário.....	12
QUADRO 1 –	Classificação das DBM segundo a ANDI.....	16
FIGURA 2 –	Habilidades adquiridas por células tumorais.....	25
FIGURA 3 –	Hipótese dos dois eventos de Knudson revisada.....	28
FIGURA 4 –	Posição dos sete marcadores de microssatélites no braço curto do cromossomo 3.....	42
FIGURA 5 –	Exemplo de paciente não informativa (homozigota) para o marcador D3S1300.....	45
FIGURA 6 –	Exemplo de paciente informativa (heterozigota) para o marcador D3S1263.....	45
GRÁFICO 1 –	Idades das pacientes com diferentes alterações histopatológicas associadas ao FA.....	50
GRÁFICO 2 –	Presença de hiperplasia em FA simples e complexos.....	51
GRÁFICO 3 –	Distribuição da idade das pacientes, do tamanho das lesões e do número de nódulos em FA simples e complexos.....	52
GRÁFICO 4 –	Distribuição do tamanho dos tumores e reta de regressão obtida em função da idade das pacientes.....	53
GRÁFICO 5 –	Distribuição das variações do número de nódulos e reta de regressão obtida em função da idade das pacientes.....	54
GRÁFICO 6 –	Distribuição do número de nódulos e do tamanho dos tumores em FA simples e complexos.....	55
GRÁFICO 7 –	Presença de LOH e MOH em fibroadenomas simples e complexos.....	58
FIGURA 7 –	Adenose Simples e Esclerosante.....	86
FIGURA 8 –	Metaplasia Apócrina e Calcificação Epitelial.....	87



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Frequência relativa (%) da incidência de DBM de acordo com a faixa etária.....	18
TABELA 2 –	Características dos marcadores microssatélites selecionados para a análise de LOH no braço curto do cromossomo 3, segundo o GDB.....	41
TABELA 3 –	Concentração dos reagentes na reação de PCR.....	43
TABELA 4 –	Frequência dos tipos de lesão observadas na amostra.....	48
TABELA 5 –	Frequência de alterações histopatológicas em 141 casos de fibroadenoma analisados.....	49
TABELA 6 –	Média de idade das pacientes com diferentes alterações histopatológicas.....	50
TABELA 7 –	Média da idade das pacientes, do tamanho das lesões e do número de nódulos para cada tipo patológico de fibroadenoma.....	52
TABELA 8 –	Genótipo das pacientes analisadas para os sete marcadores microssatélites.....	56
TABELA 9 –	Frequência de heterozigose dos marcadores microssatélites na amostra analisada e de acordo com o GDB.....	56
TABELA 10 –	Frequência de LOH e MOH para os sete marcadores microssatélites.....	57
TABELA 11 –	Média da idade, do tamanho das lesões e do número de nódulos em pacientes com MOH e LOH.....	59
TABELA 12 –	Média da idade, do tamanho das lesões e do número de nódulos em pacientes com FA simples e LOH e MOH.....	59
TABELA 13 –	Média da idade, do tamanho das lesões e do número de nódulos em pacientes com FA complexo e LOH e MOH.....	59
TABELA 14 –	Comparação de LOH e MOH nos sete marcadores microssatélites em fibroadenomas e carcinomas.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ad: Adenose simples e esclerosante  
ANDI: Aberrações Normais do Desenvolvimento e Involução  
*BAP1 : BRCA1 Interacting Protein 1*  
BCSC: *Breast Cancer Surveillance Consortium*  
*BRCA1: Breast Cancer 1*  
CA: Carcinoma  
CCR: Câncer Colorretal  
CGH : Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization*)  
CLIS: Carcinoma Lobular *in situ*  
DBM: Doenças Benignas da Mama  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)  
Ect Duc: Ectasia ductal  
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)  
EGF/TGF- $\alpha$ : Fator de crescimento epidermal/ fator de crescimento transformador  $\alpha$   
FA: Fibroadenoma  
FAC: Fibroadenoma Complexo  
FAs: Fibroadenomas  
*FANCD2: Fanconi Anemia Complementation Group D2*  
FAS: Fibroadenoma Simples  
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos  
*FHIT: Fragile Histidine Triad*  
Fib Est: Fibrose estromal  
GDB: *Genome Database*  
HA: Hiperplasia atípica  
HD: Hiperplasia Ductal sem atipia  
Hial: Hialinização  
Hiper: Hiperplasia epitelial  
HNSG: Hospital Nossa Senhora das Graças  
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
LOH: Perda de Heterozigose (*Loss of Heterozygosity*)  
MA: Metaplasia apócrina  
MOH: Manutenção da Heterozigose (*Maintenance of Heterozygosity*)  
MSI: Instabilidade de Microssatélite (*Microsatellite Instability*)  
NSABP: *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*  
NCI: Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*)  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PBS: Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate buffered saline*)  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)  
*RARB: Retinoid Acid Receptor Beta*  
*RASSF1: Ras Association Domain Family Protein 1*  
*RBM5: RNA Binding Motif Protein 5*  
RE: Receptor de Estrogênio  
*ROBO1: Roundabout, Drosophila homolog of 1*  
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio  
*THRB: Thyroid Hormone receptor Beta 1*  
*VHL : Von Hippel-Lindau*  
3p: Braço Curto do Cromossomo Três

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	11
2.1. O TECIDO MAMÁRIO	11
2.1.1. Desenvolvimento Mamário e Influência Hormonal	12
2.2. DOENÇAS BENIGNAS DA MAMA	15
2.2.1. Incidência	17
2.2.2. Fibroadenoma	18
2.2.2.1. Diagnóstico e Tratamento	21
2.3. DBM E RISCO DE CÂNCER DE MAMA	22
2.4. ALTERAÇÕES GENÉTICAS TUMORAIS	25
2.4.1. Perda de heterozigose	27
2.4.1.1. Métodos disponíveis para avaliação da LOH	30
2.4.2. Alterações Genéticas em DBM	30
2.4.3. Perda de heterozigose na região 3p	32
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	35
<b>4. OBJETIVOS</b>	36
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	37
5.2. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	38
5.3. EXTRAÇÃO DO DNA SANGUÍNEO E TUMORAL	39
5.4. ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)	41
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	47
<b>6. RESULTADOS</b>	48
6.1. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA	48
6.1.1 Histopatologia	48
6.1.2 Fibroadenoma Simples (FAS) X Fibroadenoma Complexo (FAC)	51
6.2. MARCADORES MICROSSATÉLITES EM 3p	55
6.2.1 Informatividade e Grau de Heterozigose	55
6.2.2 Perda de Heterozigose em 3p	56
6.2.2.1 Parâmetros Histopatológicos e Clínicos	57
6.2.2.2 Fibroadenomas (FA) X Carcinomas (CA)	59
<b>7. DISCUSSÃO</b>	61
7.1 EPIDEMIOLOGIA	61
7.2. PERDA DE HETEROZIGOSE	68
<b>7. CONCLUSÃO</b>	75
<b>REFERÊNCIAS</b>	76
<b>GLOSSÁRIO</b>	86
<b>APÊNDICES</b>	88

## 1. INTRODUÇÃO

As patologias benignas da mama não têm sido, em geral, clinicamente valorizadas comparativamente ao câncer mamário, apesar de serem muito mais frequentes, ocorrendo em 30 a 50% das mulheres, principalmente em idade reprodutiva. Fibroadenoma é o tipo mais frequente de lesão benigna da mama em mulheres de 15 a 30 anos de idade e no Brasil é a causa de aproximadamente 10% das consultas médicas em clínicas de mastologia (BURBANO *et al.*, 2001).

Além da alta incidência, as doenças benignas da mama merecem atenção devido ao impacto na qualidade de vida das pacientes e ao potencial maligno de alguns de seus tipos histológicos. O aumento de risco para o desenvolvimento do câncer de mama observado em mulheres com lesões benignas, incluindo o fibroadenoma, apresenta grande variação, sendo que as características histológicas da lesão e a presença/ausência de história familiar de carcinoma mamário são os fatores mais importantes para a determinação do risco. Os fibroadenomas apresentam um amplo espectro de alterações epiteliais e estromais associadas e o aumento do interesse na avaliação histopatológica destas lesões deve-se principalmente ao risco relativo de 3,1 de desenvolvimento de carcinoma mamário para os fibroadenomas complexos (DUPONT *et al.*, 1994).

O câncer é reconhecido como uma doença genética, e acredita-se que a progressão de células normais a estágios hiperplásicos e neoplásicos seja causada por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (SUGIMURA, 1998). Dois tipos principais de mutações estão associados à formação de tumores: mutações que ativam os oncogenes e mutações que inativam os genes supressores de tumor, como por exemplo as deleções (WEINBERG, 1991).

A perda de heterozigose envolvendo marcadores polimórficos no braço curto do cromossomo 3 é uma alteração genética frequentemente observada em diversos tumores epiteliais humanos, o que indica a existência de genes supressores de tumor localizados nesta região (MAITRA *et al.*, 2001). Estudos de perda de heterozigose demonstraram uma variedade de perdas em 3p tanto em câncer de mama como em alterações benignas, o que sugere que perdas nessa região devem ocorrer precocemente na tumorigênese mamária (EUHUS *et al.*, 1999).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O TECIDO MAMÁRIO

A glândula mamária consiste de um epitélio secretor (parênquima) envolvido por um estroma de tecido conectivo e adiposo e uma rede de capilares. A porção parenquimal é formada por dois tipos de células epiteliais: as luminais glandulares e as mioepiteliais basais. As primeiras são responsáveis por formar a camada interior dos ductos e alvéolos e pela síntese e passagem do leite, enquanto que as células mioepiteliais formam os elementos contrácteis que permitem ejeção do leite. Estas células, juntamente com a porção estromal, produzem os componentes da matriz extracelular, que assim como hormônios e fatores de crescimento são essenciais para o crescimento, funcionamento e morfogênese da glândula mamária (NANDI *et al.*, 1995).

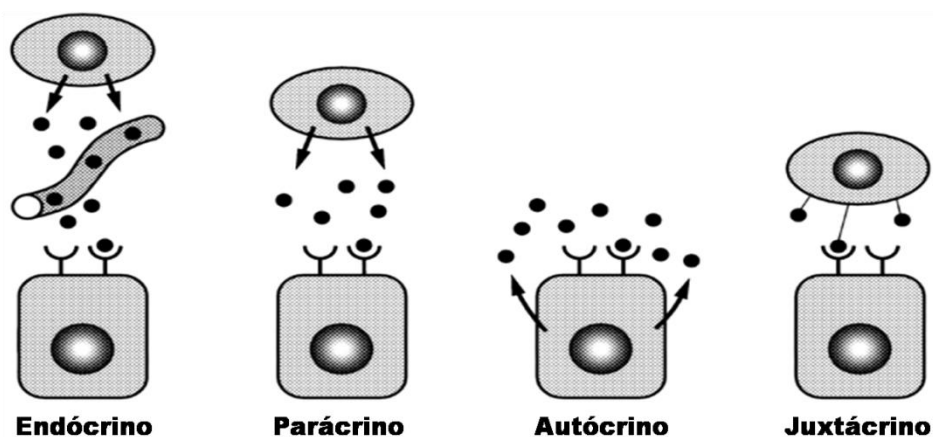
Esse modelo de duas células foi muito importante para a compreensão dos processos patológicos do tecido mamário humano nas últimas décadas. Entretanto, existe um acúmulo de evidências que indicam que o mesmo é muito simplista e que a mama apresenta uma estrutura celular mais complexa, com um sistema integrado de renovação celular do epitélio mamário, semelhante ao da próstata e da epiderme. Recentemente, estudos de ultraestrutura, imunohistoquímica e expressão gênica identificaram um terceiro tipo celular na mama, localizado tanto nas camadas basais quanto nas luminais (BÁNKFALVI *et al.*, 2004). Baseada nessas informações é proposta a existência de células tronco epiteliais mamárias responsáveis pela formação de novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (CLARKE e FULLER, 2006). Evidências indicam que essas células têm capacidade de originar células luminais e mioepiteliais (DONTU *et al.*, 2003; ALLRED *et al.*, 2004). Essas células tronco bipotentes são possivelmente o local de origem das neoplasias, podendo seguir duas vias de evolução: a luminal-glandular que origina os carcinomas de subtipo luminal e a mioepitelial que origina os de subtipo basal (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). Este modelo de uma célula progenitora funcional também se mostrou válido para explicar e diferenciar os variados tipos de proliferações epiteliais intraductais (como a hiperplasia ductal típica e os carcinomas ductal e lobular *in situ* e invasivo). Além disso, explica a heterogeneidade biológica e

morfológica das doenças proliferativas benignas e auxilia na compreensão das vias de carcinogênese mamária (BÁNKFALVI *et al.*, 2004).

### 2.1.1. Desenvolvimento Mamário e Influência Hormonal

O tecido mamário é controlado por um complexo sistema de fatores, como hormônios que agem através de seus receptores e um grande número de fatores locais. As principais moléculas que realizam esse controle são: hormônios endócrinos, secretados na corrente sanguínea por órgãos como os ovários; hormônios parácrinos, secretados para influenciar tipos celulares adjacentes; hormônios autócrinos, que atuam na própria célula secretora através de receptores intra ou extracelulares; e fatores juxtácrinos, situados na superfície de uma célula e que influenciam as células adjacentes por contato direto (FIGURA 1). A interação desses hormônios e outros fatores locais derivados (como proteínas de adesão celular) produz as vias de sinalização que são responsáveis pela regulação e estimulação celular dos tecidos mamários (COURTILLOT *et al.*, 2005).

FIGURA 1 – Fatores que controlam o desenvolvimento mamário



FONTE: Modificado de ABE, 2000.

A glândula mamária sofre mudanças cíclicas em resposta à flutuação hormonal do ciclo menstrual. As células epiteliais respondem a essas mudanças hormonais sistêmicas através de proliferação, diferenciação ou morte celular programada (apoptose). Esta resposta epitelial é limitada a uma pequena fração de

células, sugerindo também a existência de regulação local neste tecido. Além da influência da fase do ciclo menstrual, outros fatores modificam a proliferação e a apoptose no tecido mamário, como a idade, o uso de contraceptivos orais e a gravidez (NAVARRETE *et al.*, 2005).

A principal característica do desenvolvimento mamário feminino entre os 15 e 25 anos de idade é a adição de estruturas lobulares ao sistema de ductos já formado. Até aproximadamente os 35 anos de idade, a fase lútea do ciclo menstrual está associada com uma alta proliferação de ácinos e lóbulos, estimulada pela produção de estrógeno e progesterona pelos ovários. Entretanto, a maior taxa de proliferação da glândula mamária ocorre durante a gravidez, indicando a influência de outros hormônios. O repetido ciclo de mudanças, com proliferação e involução das estruturas mamárias devido à menstruação e gravidez, que ocorre entre os 15 e 50 anos de idade, gera muitas oportunidades para que ocorram pequenas disfunções (NANDI *et al.*, 1995; HUGHES *et al.*, 2000; COURTILLOT *et al.*, 2005).

BEATSON (1896) foi o primeiro a sugerir a influência da atividade ovariana na formação e progressão do câncer de mama em humanos. A primeira prova experimental do potencial tumorigênico dos hormônios sexuais foi dada por Lacassagne em 1932, através do desenvolvimento de tumores mamários em camundongos machos e fêmeas após o tratamento com líquidos foliculares de ovários pré-menopausa (apud CAVALIERI *et al.*, 2000). Na última década, estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando hormônios esteróides sintéticos e naturais comprovaram o potencial destas substâncias na formação e progressão de tumores malignos e benignos (MESIA-VELA *et al.*, 2002; MUTI, 2005).

Os ovários produzem três classes de esteróides sexuais: estrógenos, progesterona e andrógenos. O mecanismo pelo qual os hormônios esteróides estimulam a proliferação do epitélio mamário ainda é controverso e está sobre intensa investigação. Vários estudos sugerem que a regulação da proliferação celular ocorre por três mecanismos principais: mediado por receptor; *loop* autócrino/parácrino; e *feedback* negativo (MUTI, 2005; NAVARRETE *et al.*, 2005).

Dentre as influências hormonais, altos níveis de estrógenos têm sido apontados como um dos principais fatores no aumento da divisão celular. No tecido mamário normal, apenas uma pequena fração de células epiteliais expressa os receptores de estrogênio (RE). O RE é um fator de transcrição dependente de ligante que pode regular a transcrição gênica tanto direta quanto indiretamente, e

pode estimular ou inibir efeitos biológicos específicos. A ligação do estrógeno ao RE pode ser modulada pela progesterona, que age como um regulador negativo da ativação por estrógeno (NAVARRETE *et al.*, 2005).

Além dos hormônios, diversas famílias de fatores de crescimento já foram descritas como importantes para a regulação do desenvolvimento mamário, como a do fator de crescimento epidermal/ fator de crescimento transformador  $\alpha$  (EGF/TGF- $\alpha$ ), a do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e a do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (NANDI *et al.*, 1995).

O risco de desenvolvimento de uma patologia mamária é aumentado pela involução concomitante que ocorre por 20 anos, entre os 35 e 55 anos de idade. Essa involução afeta os lóbulos e é altamente dependente da relação entre o epitélio e o estroma especializado do lóbulo (HUGHES *et al.*, 2000). Durante o processo de involução lobular, os tecidos conectivos intralobulares com resposta a hormônios são perdidos e substituídos por um tecido intralobular denso e fibroso. Finalmente, ao término da menopausa, a involução ocorreu extensivamente e restam apenas alguns ductos e nenhum ou poucos lóbulos. Caso o estroma desapareça precocemente, o ácino epitelial pode permanecer e formar microcistos, que podem se desenvolver em macrocistos (COURTILLOT *et al.*, 2005).

Embora a involução mamária ocorra por uma consistente sequência de mudanças histológicas, a taxa e a extensão da involução podem variar consideravelmente entre as mulheres. Este processo já foi documentado em mulheres com menos de 40 anos de idade, e portanto os fatores envolvidos não são limitados ao início da menopausa. Dentre os possíveis fatores que podem influenciar o início e a taxa da involução estão o histórico de amamentação e de gravidez da mulher (MILANESE *et al.*, 2006).

Compreender a evolução do tecido mamário e os fatores e mecanismos que regulam suas alterações estruturais e funcionais é fundamental, visto que a maioria das lesões benignas se origina desses processos naturais da vida reprodutiva. Cada fase da vida da mulher apresenta seus próprios mecanismos, e se alguma anormalidade ocorrer, uma condição benigna específica pode se desenvolver (COURTILLOT *et al.*, 2005; NAVARRETE *et al.*, 2005).



## 2.2. DOENÇAS BENIGNAS DA MAMA (DBM)

O termo “Doenças Benignas da Mama” (DBM) descreve uma variedade de lesões fisiopatológicas dos diversos componentes da mama (epitelial, estromal, adiposo e vascular) que ocorrem em resposta a perda do balanço (equilíbrio) normal da estimulação por estrógenos e progesterona durante a vida. Com uma estimulação maior de estrogênio, células epiteliais proliferam nos ductos (hiperplasia ductal e formação de cistos) e nos lóbulos (adenose). Com uma diminuição nos níveis de estrogênio, o epitélio involui e ocorre um aumento dos tecidos fibrosos nos lóbulos e no estroma (adenose esclerosante e fibrose estromal, respectivamente) (IGLESIAS *et al.*, 2007).

Existe controvérsia em relação à classificação e análise das DBM, devido ao fato das alterações fisiológicas normais da mama não serem claramente distinguíveis sob o ponto de vista clínico e histológico das alterações que ocorrem a nível patológico (GOEHRING e MORABIA, 1997).

Dois estudos foram muito importantes na compreensão e classificação das lesões benignas: o de DUPONT e PAGE (1985) e o de HUGHES *et al.* (1987). Os primeiros apresentaram uma classificação histológica que foi adotada em uma reunião de consenso pelo *College of American Pathologists*, na qual três tipos de doenças benignas foram especificados:

1 – Lesões não-proliferativas ou minimamente proliferativas: mudanças císticas simples, metaplasia apócrina, ectasia ductal, hiperplasia epitelial leve, calcificações epiteliais, fibrose periductal, adenose simples e fibroadenoma simples;

2 – Lesões proliferativas sem atipia: hiperplasia ductal moderada ou florida, papilomas intraductais, papilomas com estruturas fibrovasculares, lesões esclerosantes radiais e complexas, adenose esclerosante, e fibroadenomas complexos;

3 – Lesões proliferativas atípicas: hiperplasia lobular atípica e hiperplasia ductal atípica. Essas lesões apresentam algumas características histológicas de carcinoma *in situ*, mas por não apresentarem o número suficiente de alterações não são diagnosticadas como tal. Por definição, a maioria dessas lesões são formas incompletas de carcinoma ductal ou lobular *in situ* de baixo grau e estão associadas com um aumento de risco para carcinoma invasivo (GURAY e SAHIN, 2006; WORSHAM, *et al.*, 2007).

O segundo trabalho, de HUGHES *et al.* (1987), estabeleceu a ANDI (Aberrações Normais do Desenvolvimento e Involução) para classificar as DBM. Essa classificação admite que o tecido mamário é regulado por um intenso controle endócrino e que apresenta uma grande variedade de mudanças durante a vida reprodutiva. Desta forma, as doenças benignas seriam definidas como pequenas alterações do desenvolvimento normal da mama, devido à respostas hormonais cíclicas e à involução. Por exemplo, microcistos devem ser considerados normais e macrocistos apenas alterações da normalidade, e não doenças. A ANDI considera as transformações que ocorrem no desenvolvimento normal da mama e classifica as lesões mamárias em um espectro que inclui do normal, alteração ou anormalidade leve, até a doença (quadro 1). A maioria dos estudos epidemiológicos não utiliza nenhuma destas classificações, sendo que as DBM mais frequentemente descritas são o fibroadenoma e doença fibrocística (HUGHES, 1989; COURTILLOT *et al.*, 2005).

QUADRO 1 - Classificação das DBM segundo a ANDI

Estágio	Processo Normal	Aberração	Doença
<b>Início da vida reprodutiva (15-25 anos de idade)</b>	Desenvolvimento Lobular	Fibroadenoma	Fibroadenoma Gigante Múltiplos Fibroadenomas
<b>Meio da vida reprodutiva (25-40 anos de idade)</b>	Mudanças cíclicas da menstruação	Mastalgia Cíclica Nodularidade	Mastalgia Incapacitante
<b>Involução</b>	Involução Lobular Mudança Epitelial	Macrocistos Lesões Esclerosantes Hiperplasia Epitelial	Mastite Periductal Hiperplasia Epitelial com atipia

Existem ainda as neoplasias benignas raras, que incluem os miofibroblastoma, mioepitelioma e adenomioepitelioma. Este último representa lesões que contêm células epiteliais e mioepiteliais incluindo adenomas ductais, que são similares aos papilomas intraductais, mas possuem um padrão de crescimento mais sólido (BATEMAN, 2007).

Alguns tipos de tumores apresentam um comportamento biológico variável, como o tumor filóide ou filodes, que pode ser maligno ou benigno (BATEMAN, 2007). O tumor filodes benigno é muito similar ao fibroadenoma, enquanto que o maligno

apresenta estroma hiper celular e atípico, alta taxa de proliferação e margens infiltrantes. Em termos de tratamento cirúrgico, é importante diferenciar esse tipo de tumor do fibroadenoma (FA) porque ele deve ser retirado completamente para evitar a recorrência no local. Em casos de doença recorrente, geralmente realiza-se uma mastectomia (GURAY e SAHIN, 2006).

### 2.2.1. Incidência

A real incidência de doenças benignas da mama não é bem conhecida, devido ao fato destas lesões serem frequentemente assintomáticas, indolores, não progredirem e regredirem espontaneamente. Estas características fazem com que a maioria das mulheres não procure atendimento médico. Mulheres que apresentam um diagnóstico clínico, citológico e histológico bem definidos representam uma pequena parte de todos os casos de DBM. Entretanto, a incidência destas pode ser estimada pela sua taxa de ocorrência em estudos de autópsias e pelo conjunto de dados de amostras populacionais (GOEHRING e MORABIA, 1997).

Em uma revisão de estudos pós-morte (em autópsias), GOEHRING e MORABIA (1997) estimaram que uma em cada duas mulheres desenvolve algum grau de doença fibrocística da mama durante a vida, e que uma em cinco desenvolve o fibroadenoma mamário. Esses autores realizaram também uma meta-análise de estudos epidemiológicos dos Estados Unidos e Austrália, na qual a incidência de DBM comprovada por biópsia foi significativamente menor que a observada no estudo pós-morte, sendo que a frequência de doença fibrocística da mama foi de 8,8% e de fibroadenoma de 2,2% (em mulheres com menos de 65 anos de idade). Estes dados, comparados com os estudos de autópsia, demonstraram que apenas 10-20% das DBM seriam histologicamente diagnosticadas, possivelmente devido ao fato de que apenas as lesões clinicamente mais significativas são incluídas nos estudos epidemiológicos (COURTILLOT *et al.*, 2005).

Em 1994, o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos iniciou o *Breast Cancer Surveillance Consortium* (BCSC). Este estudo foi realizado com os registros mamográficos de sete populações, cinco das quais também possuíam os registros patológicos das lesões. Foram avaliadas 786.846 mamografias e 17.739 biópsias de mulheres com idade entre 40 e 89 anos que realizaram os exames no

período de 1996 a 2001. A tabela 1 resume os resultados de biópsia em tumores benignos e carcinoma lobular *in situ* observados neste estudo (WEAVER *et al.*, 2005).

TABELA 1 – Frequência relativa (%) da incidência de DBM de acordo com a faixa etária das pacientes

	Resultado final da Biópsia					Total (n)
	CLIS	HA	HD	FA	Outra DBM	
Total	0,8	5,1	19,6	18,5	56,1	17.739
Faixa Etária						
40-49 anos	0,6	3,6	18,6	24,4	52,7	6987
50-59 anos	1,1	5,6	19,4	15,0	58,9	5451
60-69 anos	0,7	6,7	21,4	14,6	56,6	3186
70-79 anos	1,0	5,7	20,6	14,5	58,2	1745
80-89 anos	1,1	7,3	17,3	11,6	62,7	370

Legenda: CLIS: Carcinoma Lobular *in situ*; HA: Hiperplasia atípica; HD: Hiperplasia Ductal sem atípia; FA: Fibroadenoma; DBM: Doença Benigna da Mama.

### 2.2.2. Fibroadenoma

Fibroadenomas (FAs) são tumores benignos da mama tipicamente formados por células estromais e epiteliais. Geralmente ocorrem no início da idade reprodutiva, com maior incidência entre os 15 e 35 anos de idade, porém podem também ser diagnosticados mais tardiamente (GURAY e SAHIN, 2006).

Esse tipo de tumor geralmente cresce até 1 ou 2 cm de diâmetro, permanecendo com um tamanho constante. Constitui-se de uma massa móvel, firme, bem delimitada, não dolorosa e normalmente palpável. Geralmente é único e unilateral, mas em 20% dos casos existem múltiplas lesões, que podem ocorrer na mesma mama ou bilateralmente (GURAY e SAHIN, 2006).

Lesões que apresentam mais de 5 cm de diâmetro são incomuns (4%) e caracterizam uma doença denominada fibroadenoma gigante. Ainda não se conhece a origem dos fibroadenomas gigantes, sendo possível que estes representem uma condição nova, ou que algum fator desencadeie a progressão de um FA comum para um FA gigante. Estas lesões ocorrem geralmente em mulheres grávidas ou lactantes e quando ocorrem em adolescentes (entre 10 e 18 anos de idade) são

denominadas fibroadenoma juvenil (GREENBERG *et al.*, 1998; COURTILLOT *et al.*, 2005). Caracterizam-se por apresentarem um rápido crescimento, podendo alcançar até 15 ou 20 cm de tamanho e ocasionarem distorção e assimetria da mama e mamilo, por isso, mesmo sendo benigno, sua remoção cirúrgica é clinicamente recomendada (TSE e TAN, 2005; GURAY e SAHIN, 2006).

A aparência macroscópica típica do FA é de uma massa ovóide bem circunscrita, acinzentada ou amarelada e ao corte apresenta superfície com padrão lobulado e brilhante. Microscopicamente, o FA consiste de uma proliferação dos elementos epiteliais e mesenquimais. O estroma pode se proliferar ao redor de glândulas tubulares (crescimento pericanalicular) ou comprimido entre os ductos (crescimento intracanalicular). Os dois tipos de crescimento podem ser observados em uma mesma lesão, ou um dos padrões pode estar predominando, não havendo diferença em relação ao prognóstico (TSE e TAN, 2005; GURAY e SAHIN, 2006).

FAs exibem uma ampla variedade de aspectos citológicos e histológicos; o componente epitelial pode apresentar desde ausência de atividade hiperplásica até um carcinoma *in situ* (DUPONT *et al.*, 1994). Aproximadamente 50% dos fibroadenomas contêm outros tipos de alterações proliferativas da mama, algumas delas com uma baixa significância clínica. No estudo de KUIJPER *et al.* (2001) onde foi realizada a análise histopatológica de 396 FAs, foi verificado em 10–40% das lesões hiperplasia ductal leve/moderada, metaplasia apócrina e adenose esclerosante. Outras alterações menos comuns (5–10%) observadas foram a hiperplasia epitelial florida e a formação de cistos. A presença de hiperplasia epitelial atípica (ductal e lobular), carcinoma ductal e lobular *in situ* ou carcinoma invasivo é rara, ocorrendo em menos de 1% dos casos.

Fibroadenomas complexos são definidos como aqueles associados a alterações específicas, tais como alterações císticas e papilares, adenose esclerosante, metaplasia apócrina ou que apresentem interiormente calcificações epiteliais. Esse tipo de lesão apresenta significância clínica, devido ao seu risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama (DUPONT *et al.*, 1994; TSE e TAN, 2005; GURAY e SAHIN, 2006).

Etiopatogenicamente acredita-se que o fibroadenoma seja originado do lóbulo mamário, a partir da proliferação do estroma especializado da porção final das unidades ductais lobulares. Esta lesão apresenta dependência hormonal, aumentando de tamanho na lactação e regredindo na fase de pós-menopausa.

Apesar de ser dependente do estrogênio, pacientes com estes tumores não respondem a terapia hormonal. (TSE e TAN, 2005; NAZÁRIO *et al.*, 2007).

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento dos fibroadenomas ainda são pouco compreendidos. Além do papel dos receptores de estrogênio e progesterona expressos pelas células epiteliais, estudos recentes tem descrito um possível envolvimento de fatores de crescimento e seus receptores na patogênese e crescimento das doenças benignas de mama, como por exemplo, os fibroadenomas. Estes resultados sugerem que múltiplas vias de sinalização celular podem ser responsáveis pelo crescimento e diferenciação das lesões benignas da mama (LA ROSA *et al.*, 2001).

Uma das dificuldades em relação ao estudo da história natural dos FAs se refere a inexistência de períodos longos de acompanhamento das pacientes. Além disso, o diagnóstico definitivo da lesão só pode ser obtido com a análise histológica do tumor removido cirurgicamente (GREENBERG *et al.*, 1998). Alguns estudos acompanharam mulheres jovens por períodos variando de 1 a 9 anos, e a regressão ou o completo desaparecimento do FA foi encontrado em 16 a 59% dos casos (WILKINSON *et al.*, 1989; CANT *et al.*, 1995; DIXON *et al.*, 1996). No estudo de DENT e CANT (1989), entre os 56% dos FAs que não regrediram espontaneamente, cerca de metade permaneceu do mesmo tamanho e o restante continuou a crescer durante o seguimento clínico. Foi proposto que a probabilidade de um FA desaparecer após 5 anos é de aproximadamente 50% e que o tempo de vida desta lesão seria em torno de 15 anos (CANT *et al.*, 1995). A baixa incidência destes tumores em mulheres com idade mais avançada também apóia a hipótese de que eles regredem com o tempo. Os mecanismos descritos como responsáveis pela regressão são infarto, calcificação e hialinização (GREENBERG *et al.*, 1998).

Geralmente os fibroadenomas são considerados tumores benignos da mama, mas alguns autores que utilizam a classificação ANDI os consideram lóbulos hiperplásicos (GURAY e SAHIN, 2006). Para COURTILLOT *et al.* (2005), fibroadenomas não devem ser considerados uma neoplasia, pois todos os elementos celulares são normais e o epitélio e mioepitélio mantêm uma relação normal. Segundo estes autores, estudos moleculares como o de NOGUCHI *et al.* (1993) demonstraram que FAs são policlonais, característica de hiperplasias, em contraste com tumores filodes que são monoclonais, característica de condições

neoplásicas. Entretanto, outros autores observaram que em alguns casos o componente estromal de fibroadenomas é monoclonal, especialmente em casos de fibroadenomas complexos (KASAMI *et al.*, 1998) e fibroadenomas que recorreram como tumores filodes (NOGUCHI *et al.*, 1995). No estudo de NOGUCHI *et al.* (1995), os fibroadenomas e seus tumores filodes recorrentes apresentaram o mesmo padrão de inativação alélica, indicando que alguns FAs representam lesões neoplásicas e que podem progredir para tumores filodes.

#### 2.2.2.1. Diagnóstico e Tratamento

O tratamento atual de pacientes com suspeita clínica ou radiológica de FA é variado. Alguns médicos optam por fazer a retirada da lesão para a determinação mais precisa do diagnóstico, mas o tratamento conservativo é preferido quando a biópsia por punção aspirativa por agulha fina revela um diagnóstico de benignidade absoluta. Nesses casos, a paciente será tratada apenas por acompanhamento clínico periódico (GURAY e SAHIN, 2006).

O diagnóstico de FA é realizado através do exame clínico, por imagem e pela biópsia por agulha (CODD e GATELEY, 2007). A consistência palpatória geralmente é fibroelástica, mas pacientes de maior faixa etária podem apresentar calcificação distrófica no nódulo (“calcificação em pipoca”), que passa a ter consistência endurecida. A ultra-sonografia evidencia imagem nodular circunscrita, ovalada, hipoecóide e com margens bem definidas. A mamografia não é indicada em mulheres na segunda e terceira décadas de vida, pois o fibroadenoma apresenta a mesma textura radiológica do tecido mamário normal. Em faixas etárias mais elevadas, quando se indica a mamografia, o nódulo apresenta-se como uma imagem nodular circunscrita, ovalada, de média densidade e eventualmente com calcificações grosseiras, com aspecto de “pipoca”. A punção aspirativa com agulha fina é um método diagnóstico importante, pois trata-se de uma das poucas lesões benignas da mama que está associada a um diagnóstico citológico específico. Observam-se nos esfregaços grupos celulares epiteliais em dedo de luva, formando agrupamentos arborescentes e numerosos núcleos desnudos, muitas células ductais coesas em monocamadas e fragmentos de células estromais. A citologia, considerada isoladamente, tem alta sensibilidade (70 a 90%). Já o tríplice



diagnóstico (clínico, imagem e citologia) tem sensibilidade de 99,6%, com chance de resultado falso negativo menor que 1% (maior que 1% em mulheres com idade superior a 35 anos). A punção aspirativa com agulha fina é indicada especialmente para mulheres de faixas etárias mais elevadas ou quando se adota uma conduta expectante (não cirúrgica) (NAZÁRIO *et al.*, 2007).

A indicação cirúrgica é baseada na idade da paciente e nas dimensões do nódulo, sendo que o estabelecimento dos valores limite para os dois parâmetros é controverso. Geralmente, o tratamento é cirúrgico quando a paciente apresenta tumores com diâmetros maiores que 2 cm e consiste na exérese simples. Em pacientes que apresentam tumores menores que 2 cm e com menos de 25 anos de idade, pode ser realizado o acompanhamento clínico, com controle clínico e/ou ecográfico semestral, sendo indicada exérese nos casos de crescimento progressivo e conforme o desejo da paciente. Alguns estudos indicam que a maioria das pacientes que apresentam um nódulo palpável prefere removê-lo (DENT e CANT, 1989; WILKINSON *et al.*, 1989). Nos fibroadenomas múltiplos e pequenos, opta-se pelo controle clínico, evitando-se assim múltiplas incisões. Já nas mulheres com mais de 35 anos, a conduta geralmente é cirúrgica, tratamento que apresenta morbidade mínima (TAKEI *et al.*, 1999; NAZÁRIO *et al.*, 2007).

Existe também a possibilidade de escolha de opções terapêuticas menos invasivas, como a mamotomia, em que, por meio de um dispositivo gerador de vácuo acoplado a uma sonda, pode-se remover completamente tumores de tamanho intermediário (1,5 a 2 cm). Há ainda a crioablação, método que, por meio de temperaturas extremamente baixas (chegando a -196°C), provoca necrose do tumor, o qual é reabsorvido em até 95% do seu tamanho ao final de 12 meses do procedimento (NAZÁRIO *et al.*, 2007).

### 2.3. DBM E RISCO DE CÂNCER DE MAMA

Desde que as doenças benignas da mama passaram a ser distinguíveis do câncer de mama, a relação das condições benignas com o desenvolvimento de uma doença maligna se tornou uma questão controversa (WORSHAM, *et al.*, 2007).

Em 1998, a reunião de consenso patrocinada pelo *College of American Pathologists* formulou uma classificação das DBM baseada no risco de subsequente



desenvolvimento de câncer. Esta análise de risco apresentou os seguintes resultados (WORSHAM *et al.*, 2007):

- Lesões não-proliferativas ou minimamente proliferativas não demonstraram um aumento no risco de desenvolvimento de carcinoma;
- Lesões proliferativas sem atipia estavam associadas com um aumento de risco relativo de 1,5 a 2 vezes;
- Lesões proliferativas atípicas apresentaram um grande aumento de risco, estimado entre 5 a 10 vezes.

Outros estudos retrospectivos e prospectivos mais recentes mostraram um risco relativo para câncer de mama de 1,5 a 1,6 para mulheres com DBM quando comparadas com mulheres da população geral. Esses valores de risco apresentam uma grande variação, sendo que as características histológicas da lesão (como o grau de atipia do epitélio) e a história familiar de câncer de mama são os fatores mais importantes para a determinação do risco (HARTMANN *et al.*, 2005; WORSHAM *et al.*, 2007).

Ainda há controvérsia sobre o risco associado às lesões não-proliferativas benignas comuns e à extensão na qual a história familiar influencia o risco em mulheres com lesões proliferativas e atípicas. DUPONT e PAGE (1985) observaram que mulheres com lesões não-proliferativas não apresentavam um aumento de risco para o desenvolvimento subsequente do câncer de mama. No entanto, um estudo colaborativo do *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) para prevenção do câncer de mama demonstrou um risco relativo de 1,6 para mulheres que receberam um diagnóstico de DBM de baixo risco (não-proliferativa e minimamente proliferativa). Uma limitação deste estudo, no entanto, foi a falta da revisão patológica dos casos (HARTMANN *et al.*, 2005).

O primeiro estudo onde a análise histopatológica de um grande número de lesões foi realizada foi o de HARTMANN *et al.* (2005). Neste trabalho, 9087 mulheres com doenças benignas da mama diagnosticadas por biópsia foram acompanhadas por uma média de 15 anos. Os resultados encontrados foram similares aos já descritos na literatura, sendo que mulheres com lesões atípicas apresentaram uma maior incidência de câncer de mama (19%), com risco relativo de 4,24 (IC 95%: 3,26-5,41) e mulheres com doença proliferativa sem atipia apresentaram um risco relativo de 1,88 (IC 95%: 1,66-2,12). Porém, em contraste com outros trabalhos descritos anteriormente, foi encontrado um pequeno aumento

de risco no grupo com lesões não-proliferativas (risco relativo = 1,27, IC 95%: 1,15 a 1,41). A história familiar apresentou-se como um fator de risco independente, e um resultado importante foi que mulheres com lesões não-proliferativas e sem histórico familiar de câncer de mama não apresentaram um aumento de risco.

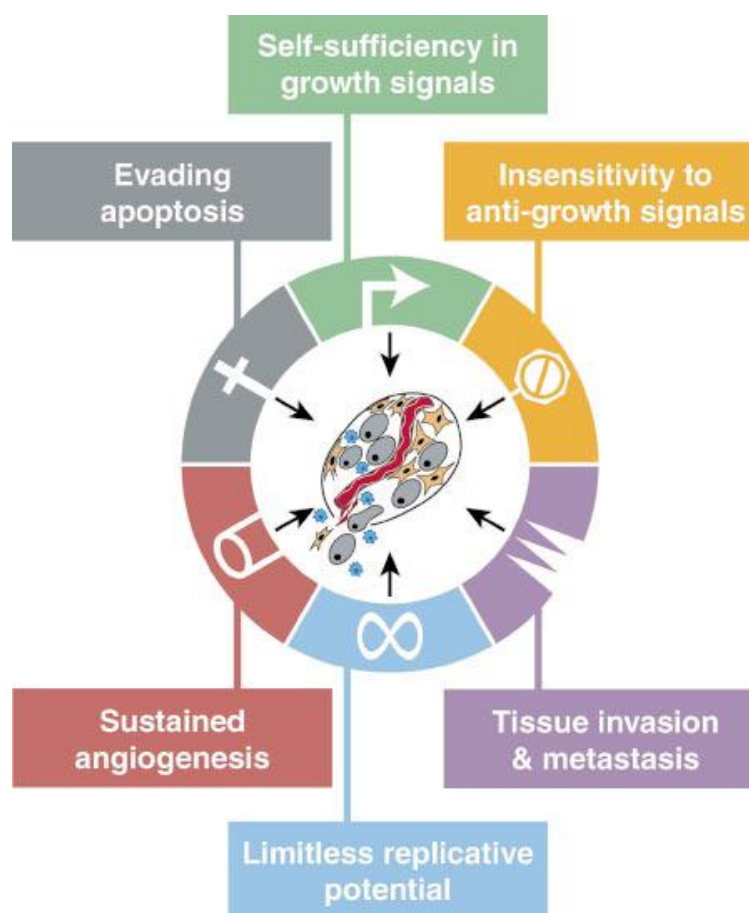
Em relação à hipótese de que precursores malignos possam estar presentes nas doenças benignas, HARTMANN *et al.* (2005) apresentaram evidências importantes, ao observarem que nos primeiros anos de acompanhamento clínico, um maior número de cânceres ocorreram na mesma mama das lesões benignas, principalmente nas mulheres com atipia. Isto sugere que precursores de câncer de mama podem existir nessas doenças benignas. Para o fibroadenoma, transformações malignas do componente epitelial foram descritas em apenas 0,02 a 0,3% dos casos (BURBANO *et al.*, 2001).

Alguns estudos analisaram apenas lesões benignas diagnosticadas como fibroadenomas, e os resultados encontrados foram semelhantes aos dos estudos onde DBM como um todo foram analisadas: o aumento do risco relativo irá variar dependendo da complexidade da lesão, do estado de proliferação do parênquima e do histórico familiar (DUPONT *et al.*, 1994; MCDIVITT *et al.*, 1992). DUPONT *et al.* (1994) encontraram um risco relativo variando de 1,42 (IC 95%: 1,1-1,8) a 7,29 (IC 95%: 2,2-24), enquanto MCDIVITT *et al.* (1992) em um estudo caso-controle observaram uma *odds ratio* que variou de 1,7 (IC 95%: 1,1-2,5) a 6,9 (IC 95%: 1,5-30,6). No primeiro trabalho, verificou-se que o aumento de risco para o câncer de mama persistiu por mais de 20 anos após o diagnóstico do FA. A partir destes resultados, conclui-se que para mulheres portadoras de fibroadenomas mamários associados à hiperplasia atípica ou as que apresentam história familiar de câncer de mama é necessário um diagnóstico mais cuidadoso e um maior acompanhamento clínico (EL-WAKEEL e UMPLEBY, 2003).

## 2.4. ALTERAÇÕES GENÉTICAS TUMORAIS

O câncer é reconhecido como uma doença genética, que ocorre pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Essas alterações se acumulam ao longo dos anos, até que a célula perde seus mecanismos de controle do crescimento e inicia um tumor (SUGIMURA, 1998). Segundo HANAHAN e WEINBERG (2000), a ampla variação de fenótipos das células cancerosas é uma manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia da célula, que coletivamente geram o crescimento maligno: auto-suficiência em fatores de crescimento; insensibilidade a fatores inibitórios ao crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial replicativo ilimitado; manutenção da angiogênese; e invasão de tecidos/metástase (FIGURA 2). Cada uma destas mudanças fisiológicas é adquirida no desenvolvimento tumoral e todas são compartilhadas pela maioria e talvez todos os tipos de tumores humanos.

FIGURA 2 – Habilidades adquiridas por células tumorais



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2000)

Dois tipos principais de alterações genéticas estão associados à formação de tumores: mutações que ativam os oncogenes e mutações que inativam os genes supressores de tumor (WEINBERG, 1991).

Os oncogenes representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares normais que controlam uma variedade de processos associados com o crescimento, proliferação e diferenciação celular. (BISHOP, 1985; 1987; GORDON, 1985; WEINBERG, 1985). A ativação dos oncogenes celulares pode dar-se por alterações reguladoras, estruturais ou por mutações de ponto. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994). As oncoproteínas caracterizam-se como versões alteradas das proteínas normais, podendo interferir no controle da proliferação celular normal em diversos níveis: interagindo com fatores de crescimento fora da célula; com o receptor na superfície celular; com a emissão da informação da membrana celular para o núcleo e, finalmente, por interação direta com o núcleo (WEINBERG, 1985).

As mutações em genes supressores de tumor são de grande importância na carcinogênese, pois as alterações que inativam estes genes “liberam” a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), causando a proliferação celular desordenada (WEINBERG, 1991). Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos da proliferação celular através do retardo na progressão do ciclo celular e bloqueio da diferenciação, ou induzindo a morte celular programada. Os produtos protéicos dos genes supressores de tumor podem ser moléculas que regulam a transcrição e o ciclo celular, como a proteína TP53, moléculas que regulam a transdução de sinais, como o produto do gene APC (5q21), receptores de superfície celular, como o gene DCC no carcinoma de cólon, genes que regulam a apoptose e genes envolvidos no reparo do DNA (WEINBERG, 1991).

A ativação de oncogenes e a inativação dos genes supressores de tumor representam, portanto, eventos complementares no desenvolvimento do câncer, ambos contribuindo para aumentar a proliferação celular e a perda do controle do crescimento normal (COOPER, 1994).

Apesar de vários modelos de progressão tumoral terem sido propostos (KNUDSON, 1971; NOWELL, 1976; VOGELSTEIN e KINZLER, 1993), acredita-se que em geral e para a maioria dos cânceres, este ocorre devido ao acúmulo de

alterações genéticas, que são responsáveis pela progressão de células morfológicamente normais a estágios hiperplásicos e displásicos, e destes em câncer invasivo e finalmente em doença metastática (GARNIS *et al.*, 2004). Muitas das alterações moleculares encontradas em câncer de mama invasivo estão presentes em lesões precursoras, corroborando a hipótese de que o câncer de mama, assim como outros tumores epiteliais, se desenvolve pelo acúmulo gradual de mutações genéticas (MAITRA *et al.*, 2001). Alguns estudos, como o de MOINFAR *et al.* (2000) demonstraram que alterações genéticas identificadas em carcinomas invasivos já estão presentes em lóbulos mamários morfológicamente normais de pacientes com carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasivo (REIS-FILHO e LAKHANI, 2003).

Alterações que ocorrem em estágios pré-malignos são mais prováveis de representarem eventos causais que iniciam e promovem o desenvolvimento do câncer. Nos estágios mais tardios da doença, a instabilidade genética promove um complexo padrão de alterações e os eventos iniciais podem estar mascarados. Por essa razão, todos os estágios de progressão devem ser considerados para entender completamente como ocorre o desenvolvimento dos tecidos malignos (GARNIS *et al.*, 2004).

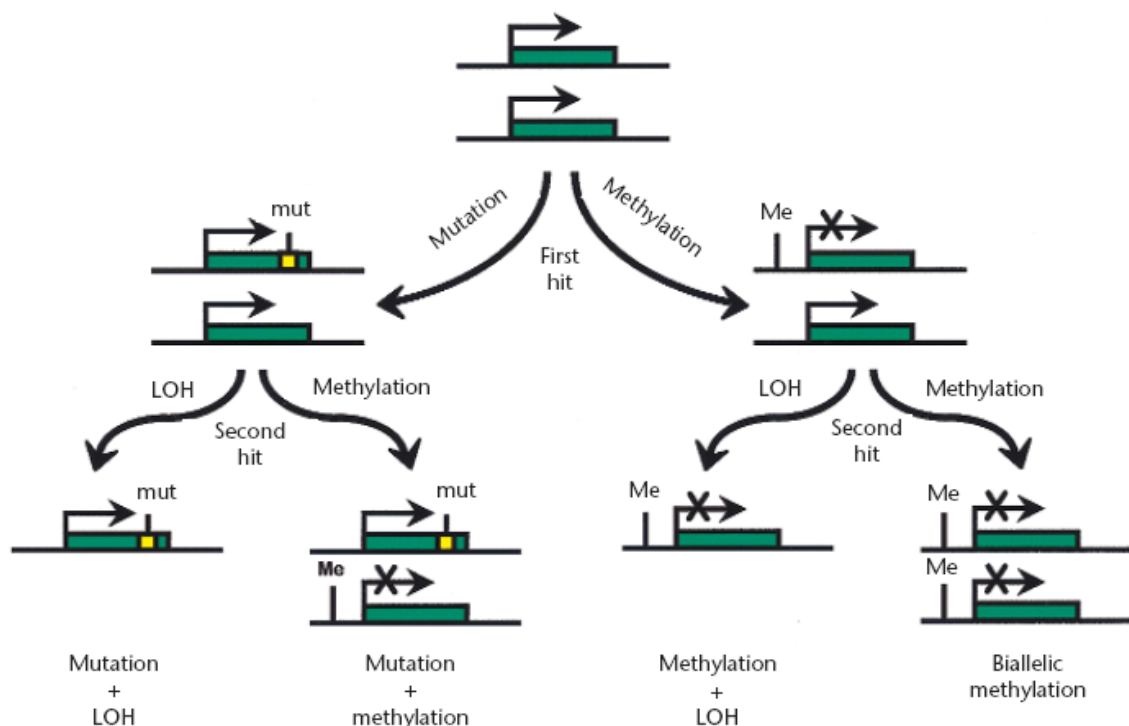
#### 2.4.1. Perda de Heterozigose (LOH)

As mutações nos genes supressores de tumor são aquelas nas quais há a necessidade de inativação dos dois alelos, e segundo o modelo de KNUDSON (1971), o primeiro alelo geralmente é inativado por mutação gênica (somática ou germinativa) e o segundo é perdido por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene em questão está localizado. Na inativação destes genes, os mecanismos que determinam a perda de sequências podem também envolver as regiões cromossômicas próximas ao gene. Assim, marcadores de DNA que demonstravam heterozigose antes da progressão do tumor podem sofrer uma deleção paralela, mecanismo conhecido como perda de heterozigose (LOH). Os principais mecanismos descritos como sendo responsáveis pelas LOH são deleção intersticial, recombinação mitótica, alterações cromossômicas estruturais e não

disjunção das cromátides durante a divisão celular (WEINBERG, 1991; THIAGALINGAM *et al.*, 2001).

A hipótese de Knudson de que dois eventos são necessários para a inativação dos genes supressores de tumor já foi observada em quase todos os cânceres humanos. No entanto, não apenas mutações gênicas e deleções são responsáveis por esta inativação. Mecanismos epigenéticos, em especial a hipermetilação de ilhas CpGs presentes nos promotores, podem causar silenciamento transcricional e por isso a metilação anormal dos genes supressores tumorais pode estar envolvida na carcinogênese (JONES e LAIRD, 1999) (FIGURA 3). Segundo YANG *et al.* (2002a) a hipermetilação e a LOH são os dois principais mecanismos de perda de função de genes supressores de tumor em carcinomas mamários esporádicos, no entanto ainda não se sabe qual dos eventos ocorre primeiro durante a tumorigênese (THIAGALINGAM *et al.*, 2002).

FIGURA 3 - Hipótese dos dois eventos de Knudson revisada



Fonte: JONES e LAIRD (1999).

Legenda: Dois alelos ativos de um gene supressor de tumor estão indicados pelos dois retângulos verdes acima. O primeiro evento da inativação gênica pode ser uma mutação de ponto (esquerda) ou repressão da transcrição por metilação do DNA (direita). O segundo evento pode ocorrer por LOH ou metilação.

Microsatélites são sequências altamente polimórficas, curtas (de 1 a 6 nucleotídeos), que se repetem em *tandem* e podem estar localizadas entre ou dentro dos genes, normalmente ocorrendo em regiões genômicas não codificantes (como íntrons, por exemplo) (PERUCHO, 1996; EUHUS *et al.*, 1999). Estas sequências são altamente polimórficas em decorrência das altas taxas de mutação nestes locos, que variam de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por geração. Existem alguns modelos que explicam essas altas taxas de mutação, como a permuta desigual, o *slippage* ou “deslizamento” durante a replicação, substituições de nucleotídeos, eventos de duplicação e os elementos transponíveis *Alu* (SCHLÖTTERER, 2000). Entretanto, é aceito que o evento mutacional mais comum nas sequências microsatélites é o “deslizamento” da enzima DNA polimerase durante a replicação de sequências altamente repetitivas, um processo que envolve o ganho ou a perda de uma ou mais unidades de repetição (LEVINSON e GUTMAN, 1987; SCHLÖTTERER e TAUTZ, 1992).

A alta frequência de ocorrência, o alto polimorfismo e a ampla distribuição genômica destas sequências as qualificam para estudos que objetivam definir regiões mínimas de perdas cromossômicas (SPEICHER, 1995; LOTHE, 1997). A presença de LOH indica que aquela sequência de DNA foi perdida durante uma divisão celular. Se a região perdida corresponder à localização de um gene supressor de tumor, a célula pode sofrer divisões celulares desreguladas que eventualmente levam à malignização (EUHUS *et al.*, 1999). Nos tumores, a alta frequência de LOH em uma determinada região do genoma indica a presença de genes supressores de tumor ou outros genes que podem estar relacionados à patogênese da doença.

Em tumores de mama primários, a perda de heterozigose é o tipo mais comum de alteração somática encontrada e apesar de centenas de trabalhos já terem avaliado LOH em cânceres mamários, a quantidade e a identidade de genes supressores de tumor relevantes para esta doença permanecem desconhecidos. Acredita-se que, para que a identificação destes genes seja possível, sejam necessários estudos que envolvam a análise de muitos tumores diferentes (OLDENBURG *et al.*, 2007). Em um estudo de meta-análise realizado por MILLER *et al.* (2003) foram avaliados 151 trabalhos da literatura, onde relatos de LOH em mais de quinze mil casos de câncer de mama foram compilados. Esta análise demonstrou que certas regiões específicas do genoma apresentavam uma maior tendência à

perda alélica, como 7q, 16q, 13q, 17p, 8p, 21q, 3p, 18q, 2q, e 19p (em ordem decrescente de significância).

#### 2.4.1.1. Métodos disponíveis para avaliação da LOH

Em relação à metodologia, três métodos são mais comumente usados para a detecção de LOH com marcadores de microssatélites: PCR radioativa visualizada por autoradiografia, PCR visualizada em géis de poliacrilamida corados com prata e PCR com iniciadores fluorescentes visualizada em sequenciador automático de DNA. A última metodologia é a que foi utilizada neste trabalho, sendo a mais utilizada atualmente por apresentar uma maior precisão e permitir que um grande número de marcadores seja utilizado ao mesmo tempo na análise de várias amostras. Outra vantagem deste método é a sensibilidade de detecção quando há uma quantidade limitada de DNA para análise e quando há contaminação com outros tipos celulares (EDWARDS e BARTLETT, 2003).

A presença de células normais no tecido tumoral é um dos principais problemas metodológicos associado à análise de LOH. Na prática, a perda completa de um alelo é raramente observada em estudos de LOH devido à contaminação com tecido normal, sendo necessário equacionar a perda alélica no tumor avaliando a proporção entre os dois alelos no sangue e no tumor. Desta maneira, a análise de LOH deve ser realizada preferencialmente através de métodos que permitam a quantificação tanto do tamanho quanto da extensão do produto amplificado. Devido a este problema muitos dos estudos utilizam métodos de microdissecção celular, para evitar ao máximo a contaminação com células normais, inflamatórias ou do estroma (TOMLINSON *et al.*, 2002).

#### 2.4.2. Alterações Genéticas em DBM

JONES *et al.* (2001) realizaram um estudo de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) em hiperplasias apócrinas e carcinomas apócrinos. O número de alterações genéticas observado foi menor nas lesões hiperplásicas. Entretanto, algumas delas foram as mesmas encontradas em carcinoma apócrino *in situ* e invasivo e em outros tipos de carcinomas mamários descritos na literatura.



A importância de alterações citogenéticas em fibroadenomas ainda não é bem compreendida. Existem poucos estudos citogenéticos disponíveis e os resultados são controversos e inconclusivos, principalmente porque o número de amostras da maioria dos trabalhos é pequeno, geralmente inferior a 10.

Estudos de CGH realizados por RIED *et al.* (1995) e CAVALLI *et al.* (2004) em fibroadenomas mamários não encontraram nenhuma alteração de ganho ou perda de material genético. Outros autores encontraram alterações, sendo que as alterações mais frequentes descritas na literatura envolvem rearranjos nos cromossomos 1, 6 e 3 (LUNDIN e MERTENS, 1998; TIBILETTI *et al.*, 2000). Foram encontradas aberrações cromossômicas em células epiteliais e estromais, sugerindo que estes dois componentes podem estar envolvidos em alterações neoplásicas (GURAY e SAHIN, 2006). Embora muitas alterações clonais e recorrentes tenham sido descritas em fibroadenomas, nenhuma aberração cromossômica específica dessa lesão foi encontrada, sugerindo que as alterações em FA podem ser consequências do processo proliferativo e não estarem relacionadas à etiologia do tumor (BURBANO *et al.*, 2001; CAVALLI *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2004).

Alterações genéticas somáticas que estão associadas ao desenvolvimento de câncer de mama também foram estudadas em DBM. WASHINGTON *et al.* (2000) avaliaram 14 microssatélites localizados em 7 braços cromossômicos (3p, 9p, 11p, 13q, 16q, 17p, e 17q) em hiperplasias ductais, metaplasia apócrina e adenose esclerosante da mama. Foram encontradas perdas alélicas em 17% das adenoses (4/23), 19% das hiperplasias (4/21) e 53% das metaplasias apócrinas (10/19). Devido à alta frequência de LOH encontrada nas metaplasias apócrinas, estes autores revisaram 14 casos de metaplasia que ocorriam adjacentes a carcinomas e em 7 desses casos observaram que as duas lesões apresentavam perdas concordantes para um ou mais marcadores.

Em relação aos fibroadenomas, alguns autores afirmam que alterações como a perda de heterozigose (LOH) e instabilidade de microssatélite (MSI) ocorrem nessas lesões, mas a incidência é baixa (MCCULLOCH *et al.*, 1998). Outros autores não encontraram nenhuma instabilidade genética, independente da complexidade da lesão (FRANCO *et al.*, 2003).

KANEKO *et al.* (2002) avaliaram a frequência de LOH e MSI em sete loci localizados nas regiões cromossômicas de 16q, 17p, 17q e 18q em áreas de hiperplasias epiteliais de carcinomas e de fibroadenomas mamários. Uma menor

frequência de LOH foi observada nas áreas de fibroadenoma (21%) que nas áreas com carcinoma (63%), sendo que apenas nestes a frequência de perda alélica foi associada ao grau de hiperplasia epitelial. Em contraste, a ocorrência de instabilidade de microssatélites foi observada em maior frequência nas áreas hiperplásicas dos fibroadenomas (28%) em comparação as dos carcinomas (11%).

WANG *et al.* (2006) realizaram uma análise de LOH em todo o genoma de tumores filodes e fibroadenomas. Perdas alélicas foram observadas em todos os casos de tumores filodes, porém com uma ampla variedade na frequência e nos locais de perda. Em contraste, nos fibroadenomas foi observada ausência ou uma baixa frequência de LOH.

#### 2.4.3. Perda de heterozigose nas regiões 3p

A perda de heterozigose envolvendo marcadores polimórficos no braço curto do cromossomo 3 (3p) é uma alteração genética frequentemente observada em diversos tumores epiteliais humanos. Pelo menos 3 regiões distintas em 3p apresentam alta frequência de perdas alélicas em tumores de mama: 3p24-26, 3p21.3-22 e 3p14.2,22–25, o que indica a existência de diversos genes supressores de tumor localizados nestas regiões (MAITRA *et al.*, 2001).

Numerosos estudos de LOH e citogenética demonstraram uma variedade de perdas no braço curto do cromossomo 3 em câncer de mama e em alguns casos, alterações em 3p também foram detectadas em lesões precursoras e benignas da mama, o que sugere que perdas nessa região devem ocorrer precocemente no desenvolvimento do câncer de mama (EUHUS *et al.*, 1999; MAITRA *et al.*, 2001).

Para o câncer de mama, alguns estudos (ROYLANCE *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2001) encontraram correlações entre as deleções e as perdas alélicas em 3p e o grau do tumor, sendo que tumores de grau III apresentaram uma maior frequência dessas alterações. Esses resultados sugerem que nessa região devem existir genes envolvidos no controle da diferenciação, e que a perda desses genes resultaria no desenvolvimento de tumores mamários mais agressivos (ROYLANCE *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2001).

Em relação às DBM, EUHUS *et al.* (1999) realizaram um estudo em lesões proliferativas da mama e encontraram LOH em 3p em hiperplasia epitelial, adenose

e adenose esclerosante, porém não observaram LOH nos fibroadenomas mamários analisados. As lesões que apresentaram perda alélica neste estudo eram provenientes de pacientes que haviam desenvolvido câncer de mama posterior ou concomitantemente ao diagnóstico de DBM. Em tumores filodes benignos observou-se perda na região 3p24, que já havia sido previamente descrita em outras lesões benignas e em tumores filodes malignos. Assim, sugere-se que perdas nessa região sejam um evento inicial no desenvolvimento de tumores epiteliais e estromais (WANG *et al.*, 2006).

No presente trabalho foram avaliados sete marcadores de microssatélites localizados em 3p: D3S1274, D3S1079, D3S1300, D3S1581, D3S1286, D3S1263 e D3S1307.

O marcador D3S1274 está localizado dentro do loco do gene *ROBO1*\*, mapeado em 3p12.3 por SUNDARESAN *et al.* (1998). A função do gene *ROBO1* está relacionada com mecanismos de interação célula-célula e a inativação ou diminuição da expressão desse gene pode resultar na perda da organização tecidual que ocorre nos estádios iniciais do desenvolvimento do câncer (HUNG *et al.*, 1995). ZABAROVSKY *et al.* (2002) observaram a hipermetilação do gene *ROBO1* em 19% dos tumores de mama invasivos. Além disso, 80% dos tumores que apresentaram-se hipermetilados para este gene também apresentaram perda alélica para outros marcadores da região 3p12, corroborando com a hipótese dos dois eventos de KNUDSON (1971) para a inativação de genes supressores de tumor (ZABAROVSKY *et al.*, 2002).

Os marcadores D3S1079 e D3S1300 estão localizados em uma das regiões mais comumente deletadas em neoplasias mamárias (3p12-3p14), região onde está localizado o gene *FHIT* (TSE e TAN, 2005). O marcador de microssatélite D3S1300 está localizado dentro do íntron 5 do gene *FHIT*, sendo um importante marcador no estudo desta região. Alterações genéticas que causam a redução na expressão do gene *FHIT* são encontradas em 30% dos tumores de mama (AHMADIAN *et al.*, 1997; GATALICA *et al.*, 2000) e são devidas a deleções internas ou hipermetilação, uma vez que mutações pontuais são raras neste gene (GATALICA *et al.*, 2000; HANBY *et al.*, 2000). TERRY *et al.* (2007), analisando a expressão da proteína FHIT por imunohistoquímica em uma grande série de lesões mamárias (n=451), não encontraram diminuição da expressão em lesões não proliferativas, mas

\*Para verificar nomenclatura correta de genes acessar: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

encontraram em 2% das DBM proliferativas sem atipia, 10% das DBM proliferativas atípicas, 27% dos carcinomas *in situ* e em 41% dos carcinomas invasivos.

O marcador D3S1581 está localizado em 3p21.3 e o gene *RASSF1* é o mais estudado como supressor tumoral nesta região (MARTINEZ *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2002b; ZABAROVSKY *et al.*, 2002). A função deste gene está relacionada com a regulação da proliferação celular através da inibição da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (SHIVAKUMAR *et al.*, 2002). MAITRA *et al.* (2001) analisaram 9 marcadores de microssatélites em 3p21 em amostras de câncer de mama e observaram frequências de LOH que variaram de 25% a 50%.

Um candidato a gene supressor tumoral localizado na região do marcador D3S1286 (3p24) é o gene *RARB* que codifica para o receptor do ácido retinóico  $\beta$ 2. Este gene atua como fator transcricional ligante-dependente modulando a expressão dos genes responsivos ao ácido retinóico, um metabólito ativo da vitamina A e  $\beta$ -caroteno que tem importante papel no controle da proliferação e diferenciação celular e na regulação da apoptose (SPORN *et al.*, 1994; ALTUCCI e GRONEMEYER, 2001).

O marcador D3S1307 localizado em 3p26.3 fica próximo ao gene *VHL*, um importante gene supressor tumoral responsável pela síndrome de von Hippel-Lindau (doença hereditária de predisposição a uma variedade de tumores malignos e benignos). A proteína codificada pelo gene *VHL* faz parte de um complexo protéico envolvido na ubiquitinação e degradação de um fator de transcrição que possui um papel relevante na regulação da proliferação celular (BARRY e KREK, 2004). Outro gene localizado próximo a essa região é o *FANCD2*, mapeado em 3p25.3 (HEJNA *et al.*, 2000), próximo ao marcador D3S1263. Esse gene codifica para uma proteína que interage com o gene *BRCA1* e é essencial no processo de resposta a danos do DNA (BARROSO *et al.*, 2006).

### 3. JUSTIFICATIVA

As Doenças Benignas de Mama (DBM), incluindo o fibroadenoma (FA), apresentam uma alta incidência em mulheres (30 a 50%), principalmente na idade reprodutiva. Apesar de serem lesões frequentes, poucos estudos investigaram os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas alterações.

A etiologia e a história natural do FA, bem como as diferenças entre os seus subtipos histopatológicos, não são bem conhecidas, e estudos epidemiológicos podem auxiliar na compreensão do início e da progressão da doença, e na definição e escolha dos procedimentos terapêuticos mais apropriados para cada subtipo.

As pesquisas em lesões benignas da mama com o acompanhamento clínico de pacientes demonstraram um aumento de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Entretanto, ainda permanece incerto quais os tipos de lesões benignas são efetivamente precursoras e quais apenas refletem um histórico de risco aumentado do tecido mamário desenvolver neoplasia maligna.

Acredita-se que a progressão de células morfologicamente normais a estágios hiperplásicos e neoplásicos é causada por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. O conhecimento destas alterações em lesões benignas é essencial para o entendimento dos mecanismos moleculares que estão envolvidos na progressão tumoral mamária.

A demonstração de perda alélica, utilizando marcadores de microssatélites polimórficos, pode ser usada para indicar uma deleção em um gene supressor tumoral específico, direcionar a busca para candidatos a genes supressores de tumor ou fornecer uma medida indireta do grau de instabilidade do DNA. Estudos que avaliam a perda de heterozigose (LOH) em lesões benignas podem fornecer informações para uma melhor compreensão do aumento de risco para câncer de mama relacionado a essas lesões. Segundo uma reunião realizada por renomados pesquisadores da área de oncologia no Reino Unido em 2006, uma das principais lacunas na pesquisa do câncer de mama é a identificação das alterações genéticas que ocorrem em doenças mamárias benignas (THOMPSON *et al.*, 2008). Além disso, compreender os mecanismos que regulam as DBM é importante para definir melhores procedimentos diagnósticos e terapêuticos com repercussões prognósticas.

#### 4. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste estudo são:

- Obter informações sobre a epidemiologia de fibroadenomas;
- Analisar a perda alélica em 3p nestas lesões, identificando regiões cromossômicas com genes supressores de tumor possivelmente envolvidos na patogênese de fibroadenomas;
- Ampliar o conhecimento sobre o possível aumento de risco para câncer de mama relacionado a essas lesões.

Para atingir estes objetivos temos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a amostra epidemiologicamente;
- Comparar as características clínicas e histopatológicas de fibroadenomas simples e complexos;
- Determinar a frequência de perda de heterozigose (LOH) em sete marcadores microssatélites mapeados em 3p em amostras de fibroadenomas mamários;
- Associar a presença de perda de heterozigose com diferentes parâmetros clínicos e histopatológicos;
- Comparar a ocorrência de LOH em 3p em fibroadenomas com a frequência descrita em carcinomas mamários;

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra consistiu-se de 141 pacientes portadoras de fibroadenomas mamários obtidas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) de Curitiba e no Hospital das Clínicas de Curitiba, entre os anos de 1998 e 2008. O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HNSG, Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003. As informações sobre os objetivos da pesquisa foram apresentadas às pacientes para a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2).

Para análise epidemiológica, as informações analisadas foram obtidas pela avaliação dos laudos histopatológicos e dos prontuários médicos das 141 pacientes portadoras de fibroadenomas. A idade das pacientes foi considerada do diagnóstico e o tamanho tumoral foi determinado pelo maior diâmetro (das três medidas normalmente obtidas e descritas no laudo histopatológico). Nas pacientes que apresentavam mais de um nódulo, considerou-se o tamanho do maior tumor.

As pacientes foram divididas em 2 grupos de acordo com a patologia da lesão: fibroadenoma simples e fibroadenoma complexo. Foram considerados FA complexos aqueles que apresentaram associadas ao tumor: alterações císticas e papilares, adenose esclerosante, metaplasia apócrina e calcificações epiteliais no interior. FA simples foram caracterizadas como aqueles que não apresentaram nenhuma das alterações características de FA complexos. Para análises comparativas entre FA simples e complexos, as pacientes com FA simples que apresentavam hiperplasia associada foram reunidas àquelas com FA complexos, já que ambas as lesões são classificadas como lesões proliferativas da mama e apresentam um aumento de risco similar (1,5 a 2 vezes) de desenvolver câncer de mama (DUPONT *et al.*, 1994).

Juntamente com a obtenção do tecido tumoral, foram obtidas, no momento da cirurgia, amostras de sangue periférico para a realização da análise de perda de heterozigose. Esta foi realizada em 111 pacientes, devido ao fato de que para algumas amostras não havia disponível, devido a utilização destas em estudos

prévios do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (UFPR), material tumoral e/ou do sangue periférico.

## 5.2. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada paciente foram coletadas cerca de 10 ml de sangue periférico, o qual foi imediatamente colocado em tubos estéreis *Vacutainer* (BD) contendo 7,2 mg de  $K_2$  EDTA ou 1,75 ml de solução anti-coagulante-ACD (0,016M de ácido cítrico; 0,068M de citrato de sódio; 0,081M de glicose, previamente autoclavados), que foram rotulados, enviados para o laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (UFPR) e mantidos a 4°C até o momento do processamento. As amostras foram então centrifugadas a 400xg por 12 minutos com solução de RCLB 1X (tampão de lise de hemácias - solução estoque 10X concentrada: 12,1 g de Tris; 10,2 g de  $MgCl_2$ ; 5,8 g de NaCl e 1000 ml de água destilada), processo repetido diversas vezes até a obtenção de um botão de glóbulos brancos, livre de hemácias. Após a separação completa, foram adicionadas 3 gotas de solução PBS (tampão de hidratação), centrifugou-se novamente a 9000xg por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante, e armazenando as amostras em freezer -80°C para posterior extração do DNA.

As amostras de tecido tumoral foram coletadas pelo médico responsável no momento da retirada cirúrgica do tumor. Um fragmento do material coletado foi encaminhado para a análise histopatológica. Outro fragmento foi encaminhado para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da Universidade Federal do Paraná. Os fragmentos de tumor foram processados (retirada manual de tecidos não tumorais e fragmentação em pedaços menores com o auxílio de tesouras e pinças estéreis), colocados em frascos estéreis identificados e estocados em condições ideais de temperatura e conservação (-80 °C), para posterior extração do DNA.



### 5.3. EXTRAÇÃO DO DNA SANGUÍNEO E TUMORAL

Para a extração do DNA sanguíneo foi utilizado o método *salting out* segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular. Esse método consiste no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA por etanol. Após o processamento do sangue, as amostras foram incubadas a 60°C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5X (750 µl de NaCl 5M, 2,4 ml de EDTA 0,5M e 10 ml de água ultra pura), 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml), 20 µl de SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio – 0,2 g/ml) e 240 µl de água ultrapura. Em seguida, foi adicionado NaCl 6M para a precipitação protéica, seguido de centrifugação (9000xg por 5 minutos) aproveitando-se somente o sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, realizou-se a precipitação do DNA com a adição de 1000 µl de etanol absoluto (seguido de centrifugação a 9000xg por 2 minutos), descarte do sobrenadante, e adição de 700 µl de etanol 70%, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. Ao final do processo, as amostras de DNA foram diluídas em 100 µl de água ultrapura e armazenadas a -20° C até o momento da amplificação por PCR.

A técnica utilizada para a extração de DNA tumoral foi a do fenol-clorofórmio. Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga os fragmentos do tecido tumoral, 80 µl de tampão da proteinase K 5X, 40 µl de proteinase K (10 mg/ml), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultrapura e esse conjunto foi homogeneizado em agitador tipo Vortex. Em seguida, o tubo foi incubado no bloco de aquecimento a 60°C por 60 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Na sequência foram adicionados 500 µl de fenol saturado pH 8,0 e 400 µl de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O tubo foi centrifugado a 9000xg por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados 50 µl de acetato de sódio 3M e 1 ml de etanol absoluto, o tubo foi invertido delicadamente várias vezes, para a precipitação do DNA, e realizou-se centrifugação nas mesmas condições acima. Descartou-se o sobrenadante e em seguida, foram adicionados 700 µl de etanol 70%. O sobrenadante foi desprezado e o tubo colocado em bloco de aquecimento a

55°C por 10 minutos para evaporação do etanol. Após, a amostra de DNA foi ressuspensa em 50 a 100 µl de água ultrapura e armazenadas a -20° C até o momento da amplificação por PCR.

Para a quantificação das amostras de DNA, foi utilizado o espectrofotômetro *Gene Quant pro (RNA/DNA calculator)*. A leitura para quantificação e pureza é procedida em comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros (nm). Para uma amostra de DNA ser considerada pura, a razão da densidade óptica OD260/OD280 deverá estar entre 1,6 e 1,8. Após a leitura, obtém-se a razão entre as absorbâncias e subsequentemente a concentração de DNA em µg/ml. Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/µl.

#### 5.4. ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)

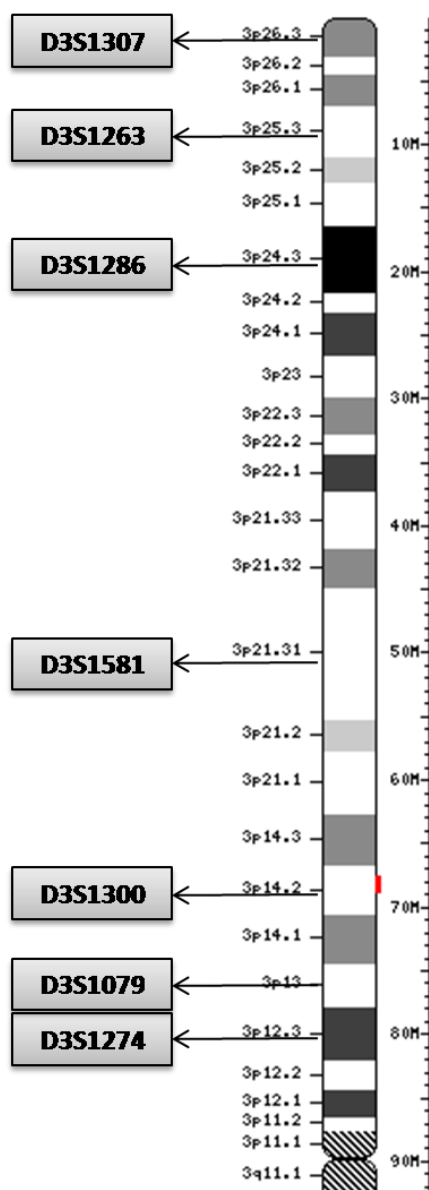
- Reação em Cadeia da Polimerase:

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para a amplificação dos sete marcadores de microssatélites em 3p através da utilização de iniciadores específicos marcados com agentes fluorescentes cujas sequências foram obtidas no *Genome Database* - GDB (<http://www.gdb.org>). A localização, sequência dos iniciadores, marcação, tamanho de fragmento amplificados na PCR e a taxa de heterozigose de cada marcador estão descritas na tabela 2. A figura 4 apresenta uma representação esquemática da localização destes marcadores em 3p.

TABELA 2 – Características dos marcadores de microssatélites selecionados para a análise de LOH no braço curto do cromossomo 3, segundo o GDB

Nome	Região	Sequência dos Iniciadores	Marcação	Tamanho do Fragmento (pb)	Heterozigose
1. D3S1274	3p12.3	5'-ttatacatcagtctctgggaaacac-3' 5'-agtgtccttgatatacgtgtca-3'	FAM	128-136	0,61
2. D3S1079	3p13	5'-atctaccattaaggcaacctg-3' 5'-tctactatgatggatagaggg-3'	HEX	133-136	0,37
3. D3S1300	3p14.2	5'-agctcacattctagtcagcct-3' 5'-gtagacccctaaccg-3'	FAM	217-241	0,83
4. D3S1581	3p21.31	5'-cagaactgccaaacca-3' 5'-gagcgaggacaatgg-3'	FAM	78-102	0,88
5. D3S1286	3p24.3	5'-gcagtgacttcagaggggc-3' 5'-cgggatcggggcagtta-3'	HEX	119-153	0,89
6. D3S1263	3p25.3	5'-ctgttgacccattgataccc-3' 5'-cttggggacgacactaaaat-3'	HEX	231-249	0,87
7. D3S1307	3p26.3	5'-gcactcatcaatgtatgggg-3' 5'-acgacgacctcacagtaa-3'	HEX	237-251	0,81

FIGURA 4 - Posição dos sete marcadores de microssatélites no braço curto do cromossomo 3 utilizados neste estudo



### Cromossomo 3

FONTE: Modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>

Inicialmente, cada microssatélite foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com um par de oligonucleotídeos específicos, nas seguintes condições (Tabela 3):

TABELA 3 – Concentração dos reagentes na reação de PCR

Reagente	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume
H <sub>2</sub> O Ultra Pura	-	-	4,2µl
Tampão	10,0X	1X	1,0µl
MgCl <sub>2</sub>	50,0mM	1,0mM	0,2µl
dNTPs	2,0 mM	0,1mM	0,5µl
Iniciadores	8,0µM	0,8µM	1,0µl
Taq DNA Polimerase	5,0U/µl	0,25U	0,1µl
DNA molde	20,0ng/µl	4,0ng/ µl	2,0µl
Volume Total	-	-	10µl

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (*Mastercycler Gradient - Eppendorf*) segundo a seguinte ciclagem: 1 ciclo - 94°C por 5 minutos; 30 ciclos - 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo - 72°C por 20 minutos.

Para os marcadores D3S1274 e D3S1079 que apresentam uma frequência de heterozigose menor, primeiro foram realizadas as amplificações do DNA do sangue periférico, e então para as pacientes informativas (heterozigotas) foi realizada a amplificação do DNA tumoral. Nos demais marcadores de microssatélites as reações de amplificação do DNA sanguíneo e tumoral foram realizadas simultaneamente.

- Corrida Eletroforética no Sequenciador *MegaBACE 1000*:

Os produtos resultantes das reações de PCRs foram unidos em dois grupos para corrida eletroforética de acordo com o tamanho do fragmento amplificado e a marcação fluorescente. O grupo 1 foi formado pelos marcadores D3S1263, D3S1286, D3S1274 e D3S1300. Foram adicionados 2,5 µl de cada produto de PCR, totalizando um volume final de 10 µl. No grupo 2 foram adicionados 2,5 µl do produto de PCR dos marcadores D3S1307, D3S1581 e D3S1079, mais 2,5 µl de água ultrapura.

A corrida eletroforética foi realizada no aparelho sequenciador *MegaBACE 1000 (GE Healthcare)*. Para a montagem da placa de injeção foi preparada uma solução contendo 785,4 µl de tween 0,02X e 30,6 µl do marcador de tamanho de

fragmento ET-ROX 400 (*Amershan Biosciences*), sendo distribuídos 8 µl dessa solução para cada poço da placa de injeção e completando-se com 2 µl do produto da PCR diluído, totalizando 10 µl por amostra.

Os produtos foram então desnaturadas a 94°C por 3 minutos e acondicionados no gelo para evitar a renaturação. As condições de corrida no *MegaBACE* foram: injeção a 3KV por 80 segundos e corrida a 8KV por 80 minutos. Após a eletroforese os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo software *Fragment Profiler 1.2* (*Amershan Biosciences*).

As pacientes cujos marcadores apresentaram-se homozigotos no sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador (Figura 5). Os marcadores que se mostrarem informativos (paciente heterozigota para aquele marcador - presença de dois alelos com uma diferença de tamanho superior ou igual a 2pb) foram avaliados quanto à perda de heterozigose no tecido tumoral (Figura 6-A e B). O software *Fragment Profiler 1.2* fornece os valores de localização, tamanho, altura e área dos picos representativos dos alelos.

FIGURA 5 - Exemplo de paciente não informativa (homozigota) para o marcador D3S1300

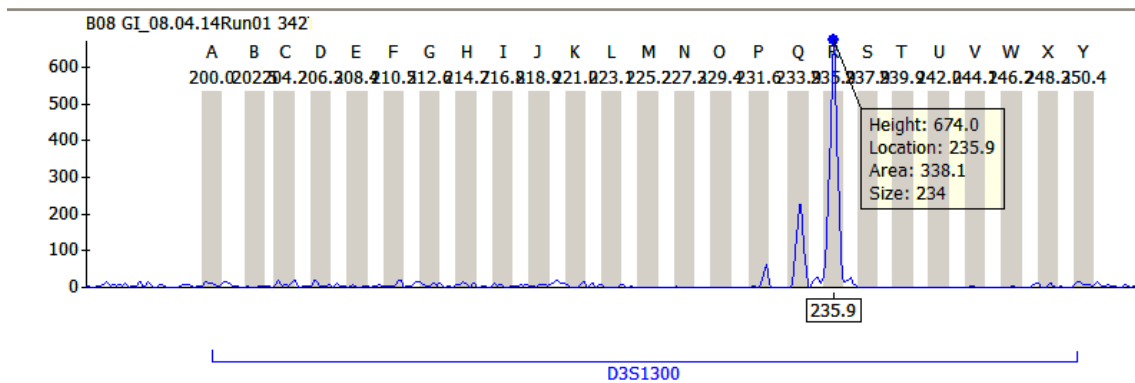
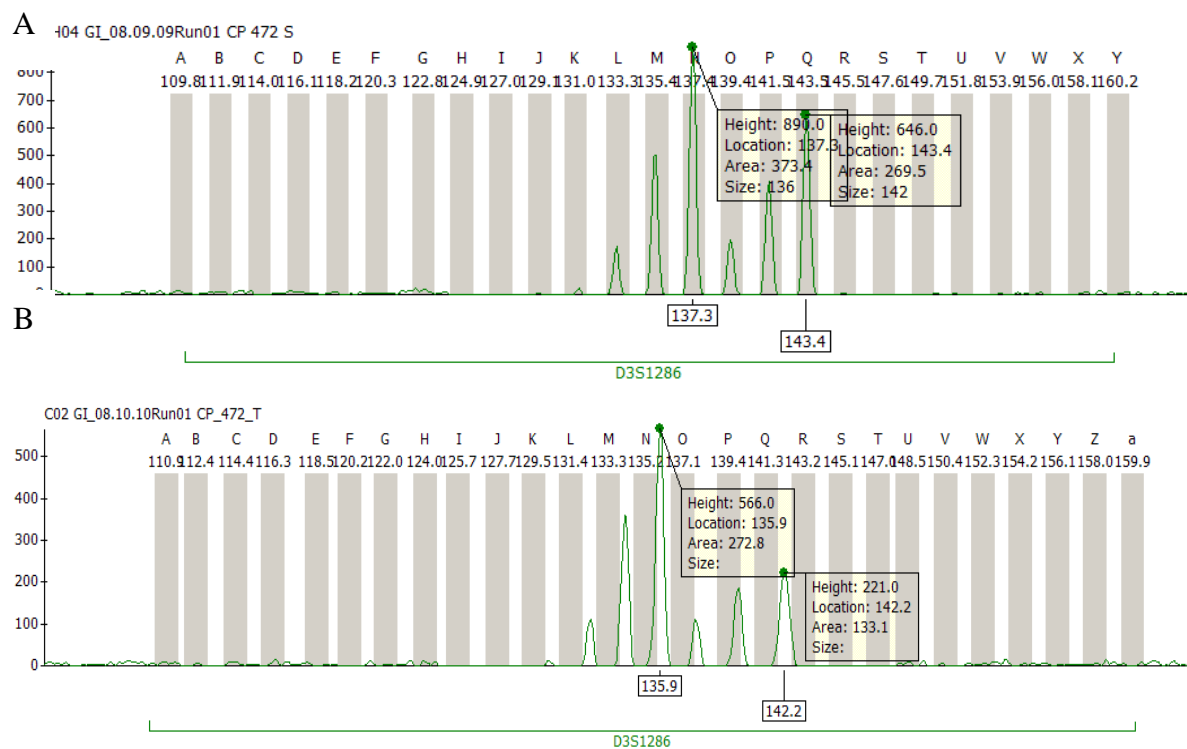


FIGURA 6 - Exemplo de paciente informativa (heterozigota) para o marcador D3S1263



Legenda: A – Amplificação de DNA sanguíneo mostrando a presença de 2 picos – caso informativo;  
B – Amostra tumoral apresentando perda parcial do alelo de maior tamanho (LOH).

- Cálculo de Perda de Heterozigose:

Nos indivíduos heterozigotos, ou seja, que apresentam os alelos de tamanhos diferentes, resultando na amplificação de dois tipos de fragmentos, estes podem não ser amplificados com a mesma eficiência durante a reação de PCR: fragmentos menores são geralmente amplificados mais rapidamente, gerando uma maior quantidade de produto ao final da reação. Por este motivo, calcula-se a proporção entre as alturas dos picos alélicos do DNA normal e tumoral, dividindo a altura do alelo de maior tamanho em pares de base (alelo 2) pela altura do alelo de menor tamanho (alelo 1). A proporção obtida no DNA normal é então dividida pela proporção alélica do DNA tumoral. A LOH portanto é determinada matematicamente utilizando-se a seguinte fórmula:

$$LOH = \frac{\left( \frac{\text{Altura do alelo normal 2}}{\text{Altura do alelo normal 1}} \right)}{\left( \frac{\text{Altura do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do alelo tumoral 1}} \right)}$$

Teoricamente a ausência de perda alélica resultaria em um valor igual a 1. Neste estudo, e de acordo com o valor comumente adotado na literatura (LARSON *et al.*, 2002; BARLETTE e STIRLING, 2003), foi considerado perda alélica quando ocorreu redução de sinal de 40% em um dos alelos tumorais. Este grau de redução indica que uma porção substancial das células da amostra tumoral apresenta a mesma alteração genética e provavelmente representam uma população clonal (BARLETTE e STIRLING, 2003). Um valor de  $LOH \leq 0,6$  indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de  $LOH \geq 1,7$  indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo de menor tamanho.

Foram realizadas repetições de todas as reações de PCR que apresentaram resultados duvidosos e das amostras que não mostraram sinal de fluorescência satisfatório para a realização do cálculo de LOH.



## 5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As frequências das alterações associadas ao fibroadenoma e de perdas de heterozigose foram obtidas por contagem direta, tanto para cada marcador isoladamente quanto para a análise conjunta.

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar a homogeneidade da distribuição das variáveis e, quando necessária, foi realizada a correção de *Yates*. A *odds ratio* foi utilizada para verificar a associação entre as variáveis.

Para a análise das diferenças entre as médias da idade e do tamanho dos tumores foram utilizados os testes *t* de *Student*, a análise da variância (*Fisher*) e o teste de *Dunnett*. O teste de *Bartlett* foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias. Para análise das diferenças entre o número de nódulos, foi utilizado o teste U de *Mann-Whitney*, pois esta variável apresentou distribuição acentuadamente assimétrica.

A dependência das variações do tamanho dos tumores e do número de nódulos em função da idade das pacientes foi avaliada pelo coeficiente de regressão (**b**) e o grau de interdependência das variações do tamanho tumoral e do número de nódulos foi analisado pelo coeficiente de correlação linear de *Pearson* (*r*).

As análises foram realizadas no programa estatístico BioEstat 4.0 e para todos os testes foi adotado valor de  $p=0,05$  como limite de significância.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

A análise epidemiológica foi realizada em 141 pacientes portadoras de fibroadenomas mamários. A média de idade das pacientes foi de  $29,69 \pm 11,93$  anos, o tamanho médio dos tumores foi  $31,49 \pm 16,01$  mm e o número médio de nódulos foi  $1,52 \pm 1,88$ . Um único nódulo foi observado em 103 pacientes (74,1%), 2 nódulos em 23 (16,5%) e 3 ou mais nódulos em 13 casos (9,3%).

#### 6.1.1. Histopatologia

Entre as pacientes analisadas 51 (36,1%) apresentaram outras alterações\* (proliferativas ou fibrocísticas) associadas ao fibroadenoma, sendo que destas, 24 (47,0%) apresentaram mais de uma alteração simultaneamente (Tabela 4). Na tabela 5 estão descritas individualmente os tipos de alterações encontrados na amostra, das quais a metaplasia apócrina foi a mais frequente sendo observada em 22 (15,6%) pacientes. O carcinoma ductal *in situ* e as hiperplasias do tipo papilare e epiteliais atípicas associados ao FA representaram eventos raros e ocorreram em apenas um (0,7%) e dois casos (1,4%), respectivamente. O fibroadenoma juvenil ou gigante foi observado em 5 (3,5%) pacientes.

TABELA 4 – Frequência dos tipos de lesão observadas na amostra

Tipo de Lesão	N	%
<b>Total de casos analisados</b>	<b>141</b>	<b>100,0</b>
<b>Apenas Fibroadenoma</b>	90	63,8
<b>Fibroadenoma associado a outras alterações</b>	51*	36,1

Legenda: \* 24 pacientes com fibroadenoma associados a outras alterações apresentaram mais de uma alteração concomitantemente

\*para definição das alterações histopatológicas ver Glossário (pág. 86).

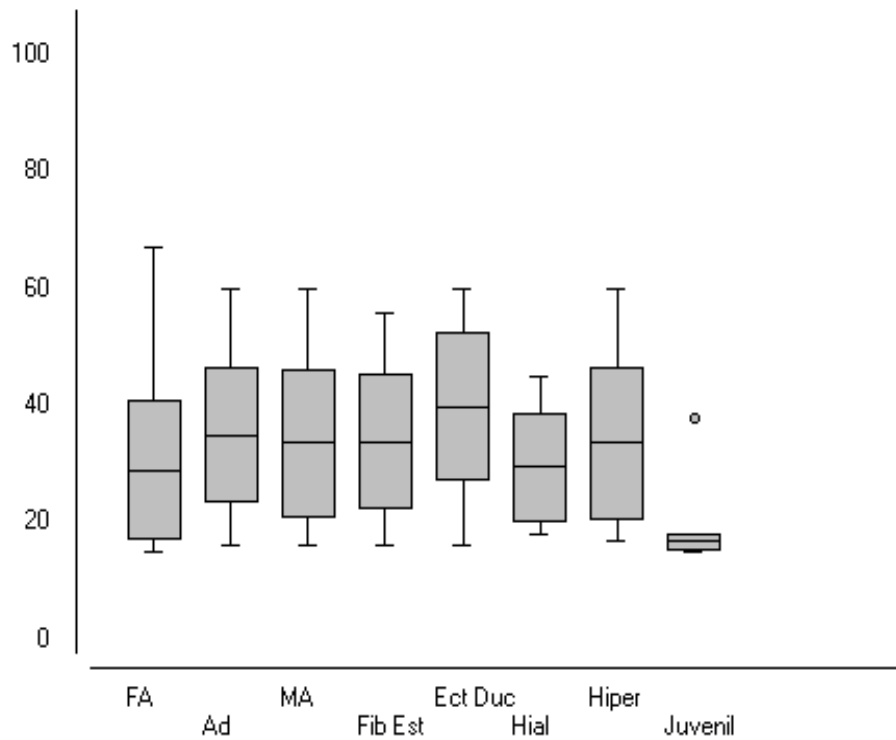
TABELA 5 – Frequência de alterações histopatológicas em 141 casos de fibroadenoma analisados

Alteração	N	%
<b>Alterações Proliferativas</b>		
Hiperplasia Papilar	1/141	0,7
Hiperplasia Epitelial Típica	18/141	12,8
Hiperplasia Epitelial Atípica	2/141	1,4
Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	1/141	0,7
<b>Alterações Fibrocísticas</b>		
Metaplasia Apócrina	22/141	15,6
Adenose Simples	14/141	9,9
Adenose Esclerosante	4/141	2,8
Fibrose Estromal	16/141	11,3
Ectasia Ductal	11/141	7,8
Hialinização	9/141	6,4
Cistificação Ductular ou Lobular	5/141	3,5

Legenda: a soma de casos com alterações é maior que o número total de casos com fibroadenoma associados a outras alterações, pois 24 pacientes apresentaram mais de uma das alterações concomitantemente.

Algumas das lesões que ocorrem concomitantes aos fibroadenomas são descritas como tendo associação com o estágio de desenvolvimento mamário da paciente. Para estas lesões foram comparadas as médias de idade entre as pacientes acometidas. No gráfico 1 estão apresentadas a distribuição das idades das pacientes para os 8 tipos de lesões analisadas e na tabela 6 as médias das idades para estas lesões. A análise da variância aplicada às informações desta tabela demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $F=2,35$ ;  $p=0,26$ ). O teste de *Bartlett*, para avaliar a homogeneidade das variâncias, apresentou um valor não significativo, igual a:  $\chi^2_{(7)}\text{corr.}=1,67$ ;  $p>0,95$ . O teste de *Dunnet* que compara as médias das idades das lesões com um grupo controle (FA) mostrou-se significativo apenas para ectasia ductal.

GRÁFICO 1 – Idades das pacientes com diferentes alterações histopatológicas associadas ao FA



Legenda: FA: apenas fibroadenoma; Ad: adenose simples e esclerosante; MA: metaplasia apócrina; Fib Est: fibrose estromal; Ect Duc: ectasia ductal; Hial: hialinização; Hiper: hiperplasia epitelial.

TABELA 6 – Média de idade das pacientes com diferentes alterações histopatológicas

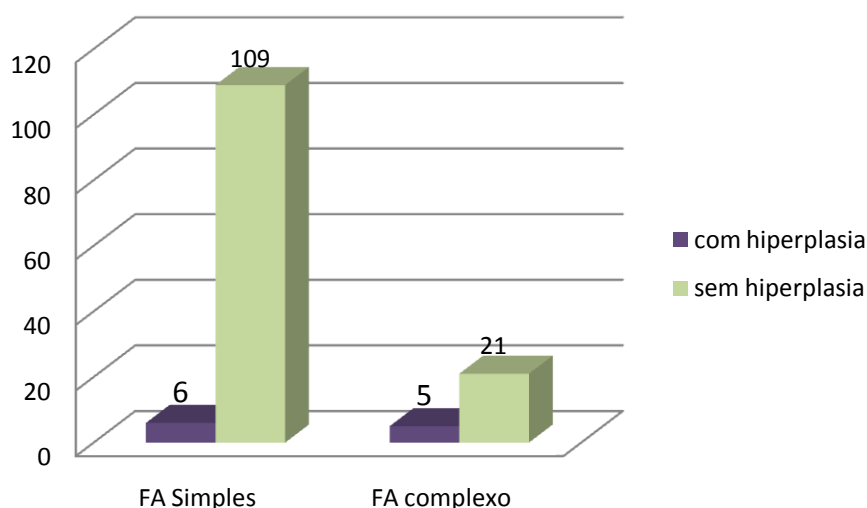
Lesão	FA	Ad	MA	Fib Est	Ect Duc	Hial	Hiper	Juvenil
<b>Número</b>	83	17	21	15	11	9	16	5
<b>Média±DP</b>	29,06 ±11,86	34,94 ±11,45	33,62 ±12,48	33,93 ±11,29	39,82 ±12,52	29,44 ±9,23	33,63 ±13,03	21,00 ±9,57
<b>Dunnett (Q)</b>	--	1,87 ns	1,58 ns	1,47 ns	2,83 p<0,05	0,09 ns	1,41 ns	1,48 ns

Legenda: FA: apenas fibroadenoma; Ad: adenose simples e esclerosante; MA: metaplasia apócrina; Fib Est: fibrose estromal; Ect Duc: ectasia ductal; Hial: hialinização; Hiper: hiperplasia epitelial; ns: não significativo.

### 6.1.2. Fibroadenoma Simples (FAS) X Fibroadenoma Complexo (FAC)

As pacientes foram divididas em 2 grupos de acordo com a patologia da lesão: fibroadenoma simples e fibroadenoma complexo, segundo critério descrito no item 5.1. deste trabalho. A maioria das pacientes apresentou FA simples (n=115; 81,56%) e 26 (18,44%) FA complexos. A presença de hiperplasia associada foi proporcionalmente superior nos FA complexos ( $5/26 = 19,2\%$ ) do que nos simples ( $6/115 = 5,22\%$ ), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 4,0$ ;  $p < 0,05$ ) e *odds ratio* igual a 4,33 (IC 95% = 1,21-15,49) (Gráfico 2).

GRÁFICO 2 – Presença de hiperplasia em FA simples e complexos



As pacientes com FA simples que apresentavam hiperplasia associada (n=6) foram consideradas com as com FA complexos para as análises subsequentes, já que ambas as lesões apresentam um aumento de risco (1,5 a 2 vezes) de desenvolver câncer de mama.

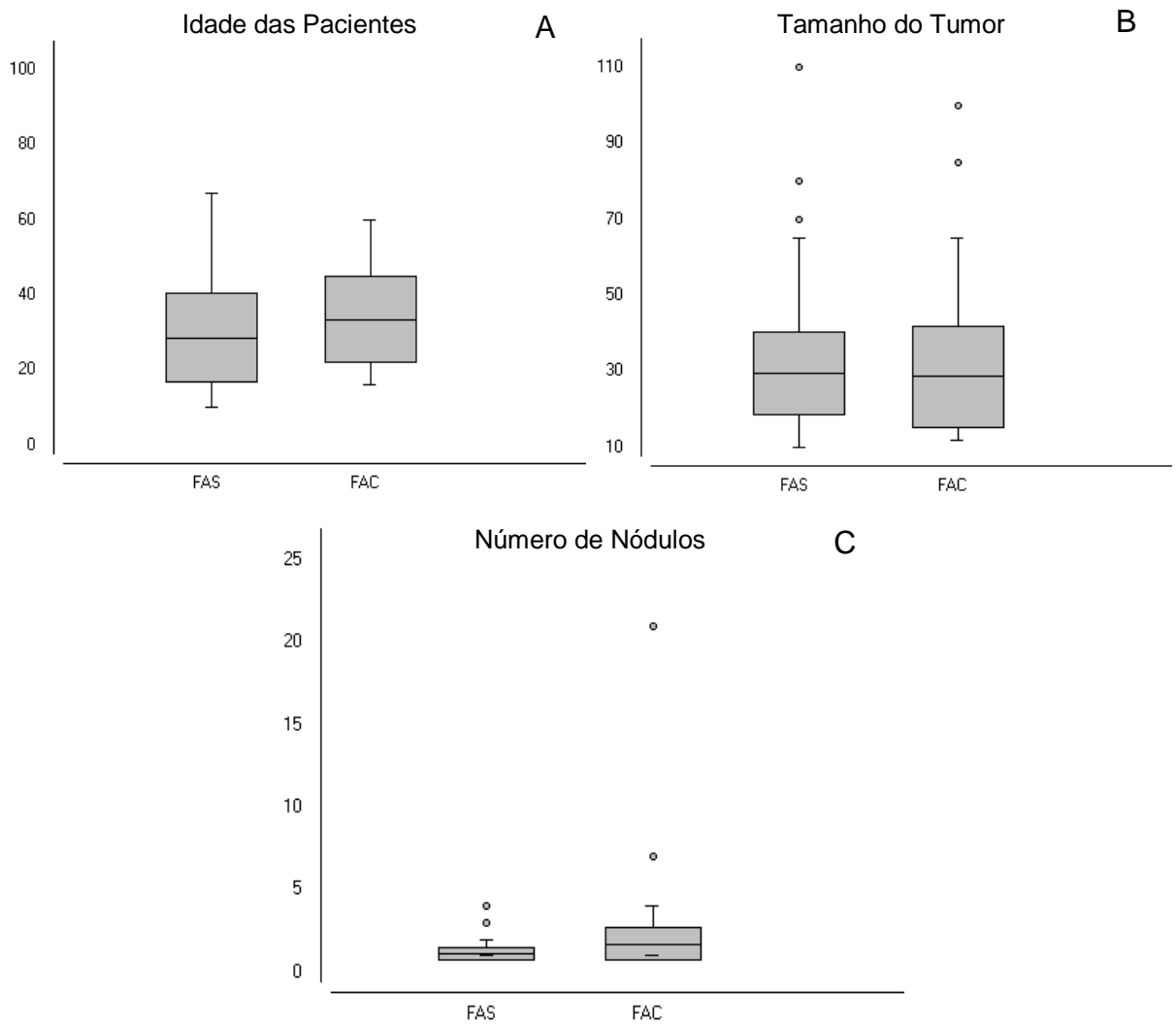
A tabela 7 apresenta as características dos dois tipos patológicos como: média de idade das pacientes, tamanho das lesões (em mm) e número de nódulos apresentados. As médias de idade e do número de nódulos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que não ocorreu para as médias do tamanho tumoral. Nos gráficos 3-A, B e C estão apresentadas a distribuição destes parâmetros em FAS e FAC.

TABELA 7 – Média da idade das pacientes, do tamanho das lesões e do número de nódulos para cada tipo patológico de fibroadenoma analisado

Parâmetro	Idade		Tamanho		Nº de nódulos	
Tipo (n)	FAS(102)	FAC(29)	FAS(106)	FAC(32)	FAS(106)	FAC(31)
Média±DP	28,60 ±11,89	33,55 ±11,43	31,13 ±14,54	32,66 ±20,37	1,23 ±0,54	2,51 ±3,69
Teste	$t = 2,00; p<0,05$		$t = 0,39; p=0,70$		$Z(U) = 2,80; p<0,005$	

Legenda: FAS: fibroadenoma simples; FAC: fibroadenoma complexo; DP: Desvio Padrão.

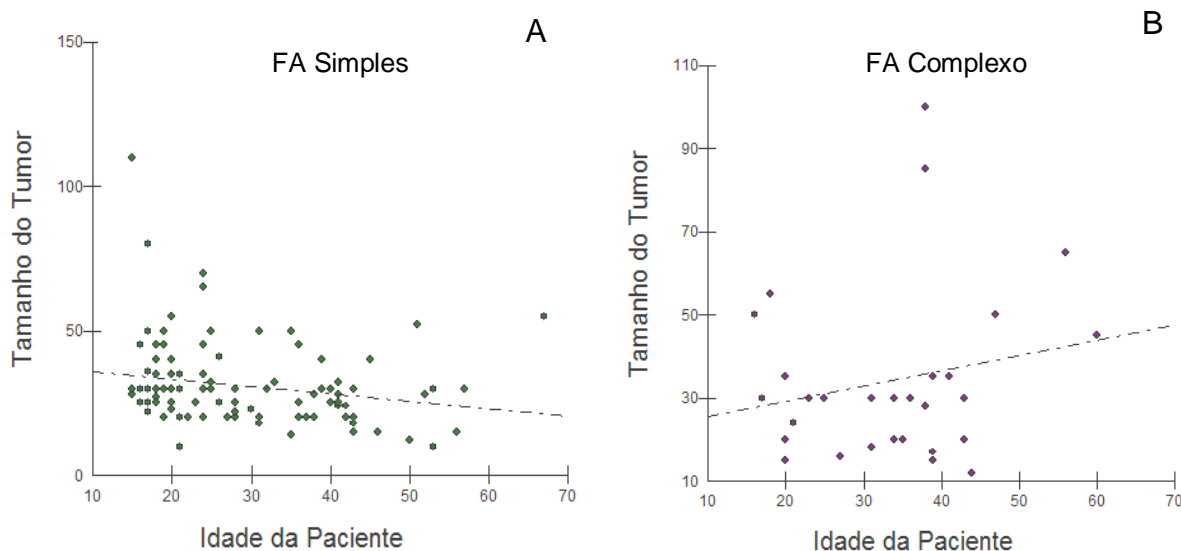
GRÁFICO 3 – Distribuição da idade das pacientes, do tamanho das lesões e do número de nódulos em FA simples e complexos



Legenda: FAS: fibroadenoma simples; FAC: fibroadenoma complexo.

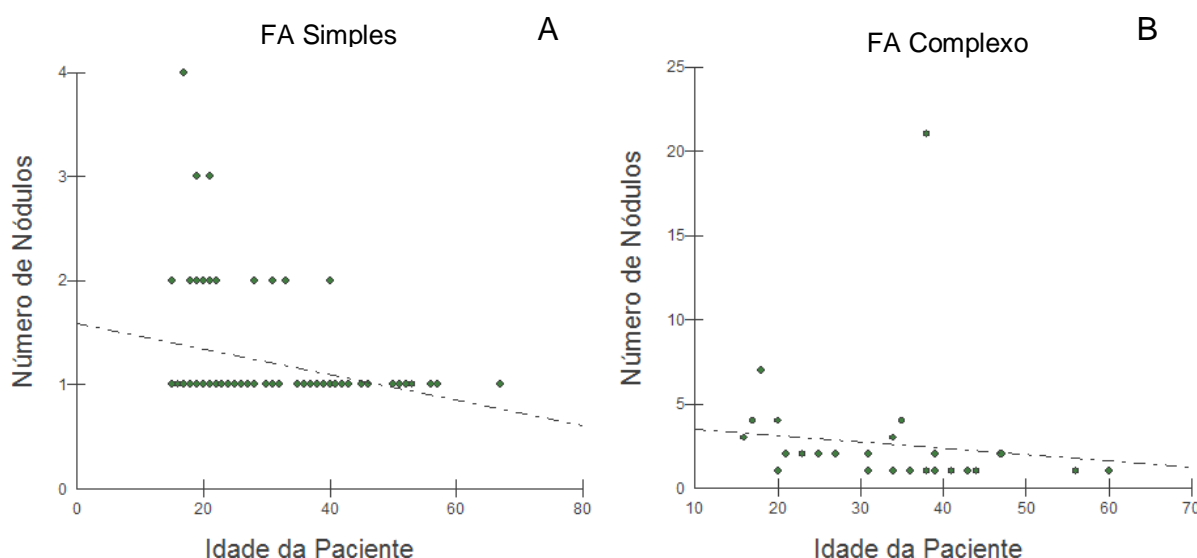
A dependência das variações do tamanho dos tumores em função da idade das pacientes foi avaliada pelo coeficiente de regressão. Observou-se um valor de **b** negativo e estatisticamente não significativo quando todas as pacientes foram analisadas (**b** = -0,099; *t* = 0,82; *p*=0,41; IC95% = -0,34 a 0,14). Entretanto, quando a mesma análise foi realizada separadamente para FA simples e complexos, observou-se um valor de **b** negativo e estatisticamente significativo para os FA simples (**b** = -0,24; *t* = 2,00; *p*=0,048; IC 95% = -0,47 a -0,001), positivo e não significativo para os complexos (**b** = 0,37; *t* = 1,07; *p*=0,29; 95% IC = -0,338 a 1,069) (Gráfico 4 – A e B, respectivamente).

GRÁFICO 4 – Distribuição do tamanho dos tumores e reta de regressão obtida em função da idade das pacientes



Através da análise de regressão também foi avaliada a dependência das variações do número de nódulos em função da idade das pacientes. Quando todas as pacientes foram analisadas, o valor de **b** foi negativo e estatisticamente não significativo (**b** = -0,0094; *t* = 0,65; *p*=0,21; IC95% = -0,038 a 0,019). Na análise dos FA simples e complexos separadamente, os simples apresentaram uma dependência negativa estatisticamente significativa das variações do número de nódulos em função da idade das pacientes (**b** = -0,0123; *t* = 2,73; *p*=0,0075; IC 95% = -0,021 a -0,003), o mesmo não se observou nos complexos, embora o valor de **b** também tenha sido negativo (**b** = -0,59; *t* = 0,59; *p*=0,56; 95% IC = -0,171 a 0,095) (Gráfico 5 – A e B, respectivamente).

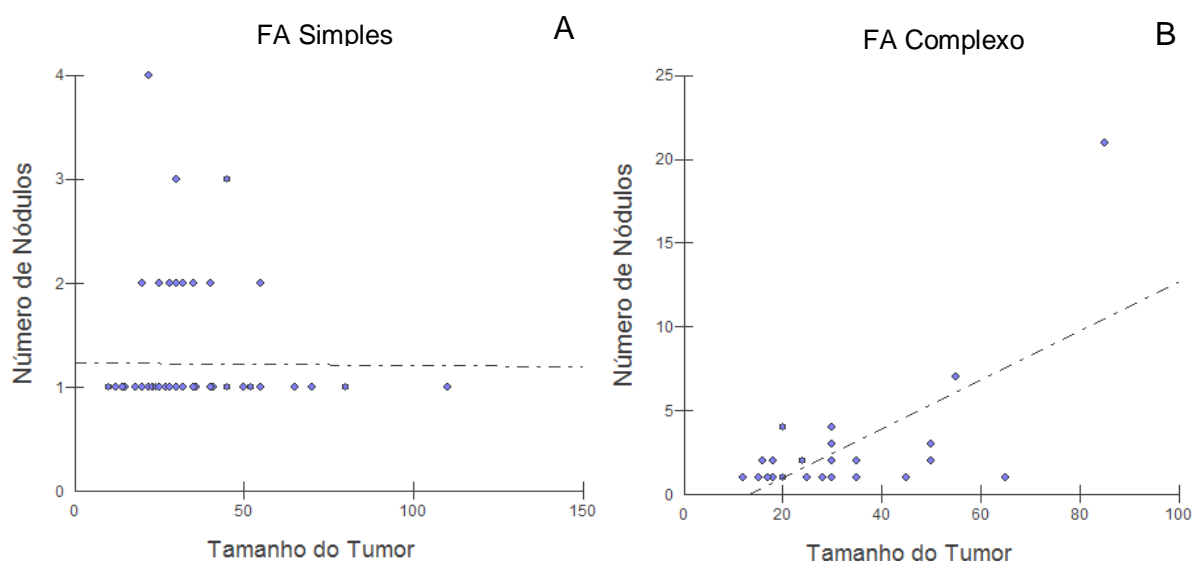
GRÁFICO 5 – Distribuição das variações do número de nódulos e reta de regressão obtida em função da idade das pacientes



O grau de interdependência das variações do tamanho tumoral e do número de nódulos foi analisado pelo coeficiente de correlação linear de Pearson. Quando todas as pacientes foram analisadas, o coeficiente de correlação apresentou um valor positivo e estatisticamente significativo ( $r = 0,30$ ;  $t = 4,0$ ;  $p = 0,0003$ ; IC95% = 0,15 a 0,45). Entretanto, quando FA simples e complexos foram avaliados separadamente, nos simples observou-se um valor de coeficiente de correlação negativo e estatisticamente não significativo ( $r = -0,0064$ ;  $t = 0,06$ ;  $p = 0,95$ ; IC 95% = -0,20 a 0,19) e os FA complexos apresentaram uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre as variáveis ( $r = 0,66$ ;  $t = 4,69$ ;  $p < 0,0001$ ; 95% IC = 0,39 a 0,82) (Gráfico 6 – A e B, respectivamente).



GRÁFICO 6 – Distribuição do número de nódulos e do tamanho dos tumores em FA simples e complexos



## 6.2. MARCADORES DE MICROSSATÉLITES EM 3p

### 6.2.1. Informatividade e Grau de Heterozigose

Neste estudo foram analisados sete marcadores de microssatélites localizados na região 3p. A genotipagem do DNA sanguíneo foi realizada em 111 pacientes (do total de 141 casos obtidos) devido ao fato de muitas amostras terem sido utilizadas em estudos prévios do laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (UFPR) e não apresentarem um dos materiais biológicos disponíveis (sangue periférico ou tecido tumoral). O número de pacientes analisadas para cada marcador de microssatélite variou devido às dificuldades de amplificação do DNA de algumas amostras (principalmente as tumorais).

A tabela 8 apresenta o número de amostras genotipadas para cada marcador e o número de heterozigotas e homozigotas, que não se apresentaram homogeneamente distribuídas nos sete marcadores ( $\chi^2_{(6)} = 166$ ;  $p < 0,0001$ ). A tabela 9 apresenta a frequência de heterozigose encontrada em cada marcador de microssatélite na amostra estudada e a descrita no *Genome Database* (GDB), sendo

que apenas para o marcador D3S1307 a frequência encontrada foi estatisticamente diferente da frequência esperada segundo o GDB.

TABELA 8 - Genótipo das pacientes analisadas para os sete marcadores de microssatélites da região 3p

	<b>Pacientes analisadas (n)</b>	<b>Homozigotos n (%)</b>	<b>Heterozigotos n (%)</b>
<b>1. D3S1274</b>	109	37 (33,94)	72 (66,06)
<b>2. D3S1079</b>	110	75 (68,18)	35 (31,82)
<b>3. D3S1300</b>	99	20 (20,20)	79 (79,80)
<b>4. D3S1581</b>	110	10 (9,09)	100 (90,91)
<b>5. D3S1286</b>	111	9 (8,11)	102 (91,89)
<b>6. D3S1263</b>	110	8 (7,27)	102 (92,73)
<b>7. D3S1307</b>	99	28 (28,28)	71 (71,72)

TABELA 9 – Frequência de heterozigose dos marcadores microssatélites na amostra analisada e de acordo com o GDB

	<b>Heterozigose amostra n (%)</b>	<b>Heterozigose GDB n (%)</b>	<b>Qui-Quadrado</b>
<b>1. D3S1274</b>	72 (66,06)	66,49 (61)	$\chi^2_{(1)} = 1,17$ ; p=0,28
<b>2. D3S1079</b>	35 (31,82)	40,70 (37)	$\chi^2_{(1)} = 1,27$ ; p=0,26
<b>3. D3S1300</b>	79 (79,80)	82,17 (83)	$\chi^2_{(1)} = 0,72$ ; p=0,40
<b>4. D3S1581</b>	100 (90,91)	96,80 (88)	$\chi^2_{(1)} = 0,88$ ; p=0,35
<b>5. D3S1286</b>	102 (91,89)	98,79 (89)	$\chi^2_{(1)} = 0,95$ ; p=0,33
<b>6. D3S1263</b>	102 (92,73)	95,70 (87)	$\chi^2_{(1)} = 3,19$ ; p=0,07
<b>7. D3S1307</b>	71 (71,72)	80,19 (81)	$\chi^2_{(1)} \text{corr.} = 4,96$ ; p=0,026

#### 6.2.2. Perda de Heterozigose em 3p

As amostras que se mostraram informativas (heterozigotas) no DNA sanguíneo foram analisadas quanto à perda (LOH) ou manutenção (MOH) da heterozigose nas amostras tumorais. As frequências de LOH foram calculadas por paciente, e as pacientes que apresentavam mais de um nódulo e material biológico disponível (n=11) foram contadas apenas uma vez. A tabela 10 apresenta o número

de pacientes informativas genotipadas no sangue e no tumor e a frequência de LOH e MOH.

Em todos os locos analisados foram observadas perdas de heterozigose, variando de 4,0% para o marcador D3S1300 a 9,1% para o marcador D3S1079. As frequências de LOH e MOH distribuíram-se homogeneamente entre os sete marcadores analisados ( $\chi^2_{(6)} = 1,67$ ;  $p=0,95$ ).

TABELA 10 – Frequência de LOH e MOH para os sete marcadores de microssatélites

	<b>Amostras Informativas (n)</b>	<b>LOH n (%)</b>	<b>MOH n (%)</b>
1. D3S1274	72	4 (5,6)	68 (94,4)
2. D3S1079	33	3 (9,1)	30 (90,9)
3. D3S1300	75	3 (4,0)	72 (96,0)
4. D3S1581	92	5 (5,4)	87 (94,6)
5. D3S1286	98	6 (6,1)	92 (93,9)
6. D3S1263	93	5 (5,4)	88 (94,6)
7. D3S1307	63	5 (7,9)	58 (92,1)

A variação no número de amostras informativas entre os microssatélites deve-se as diferentes frequências de heterozigotos de cada marcador (ver heterozigose dos marcadores - Tabela 9).

Através da análise da frequência de LOH em locos combinados foi observado LOH em pelo menos um dos sete locos em 28 pacientes (25,2%) e LOH em dois locos em 3 pacientes (2,7%). Não foram observadas LOH em mais de dois marcadores.

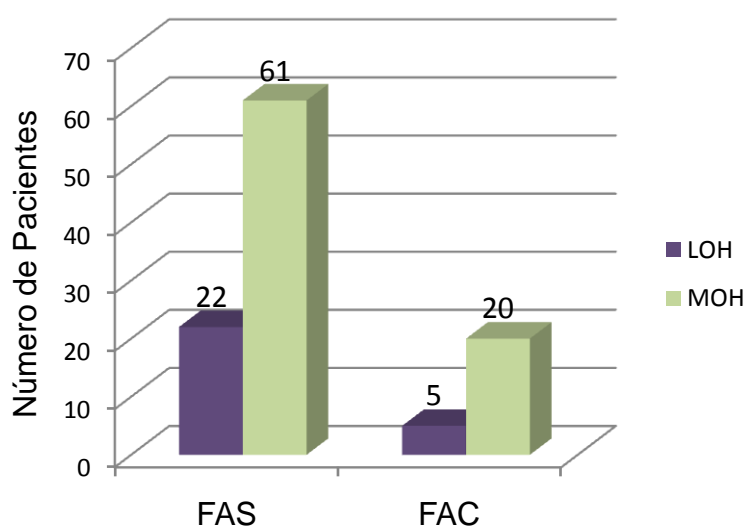
#### 6.2.2.1. Parâmetros Histopatológicos e Clínicos

Foi realizada a análise entre os parâmetros histopatológicos (tipo histopatológico, tamanho do tumor, número de nódulos e lateralidade) e clínicos (história familiar e recorrência) das pacientes e a presença de LOH nos marcadores de microssatélites. Foram incluídas somente as pacientes com a informação referente ao parâmetro em questão, o que determinou uma redução do tamanho amostral nas análises seguintes.

Em relação à histopatologia do tumor, 22 (26,5%) das pacientes com FA simples apresentaram LOH em pelo menos 1 marcador e 83 (73,5%) apresentaram manutenção da heterozigose nos locos informativos. Entre os FA complexos, 5

(20%) apresentaram LOH e 27 (80%) MOH, sendo que as frequências distribuíram-se homogeneamente entre os grupos ( $\chi^2_{(1)} = 0,43$ ;  $p = 0,51$ ) (Gráfico 7). A distribuição de LOH e MOH também foi homogênea entre pacientes com presença ou ausência de hiperplasia associada ao FA, sendo que 2 pacientes com hiperplasia apresentaram LOH e 3 MOH e 25 pacientes sem hiperplasia tiveram LOH e 78 mantiveram a heterozigose ( $\chi^2_{(1)} = 0,63$ ;  $p = 0,43$ ).

GRÁFICO 7 – Presença de LOH e MOH em fibroadenomas simples e complexos



Os parâmetros clínicos (idade da paciente) e histopatológicos (tamanho do tumor e número de nódulos) foram comparados entre pacientes com LOH, em pelo menos 1 marcador, e com MOH. Os resultados destas análises estão apresentados na tabela 11 e em nenhum dos parâmetros as médias apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A comparação das médias destes parâmetros também foi realizada para FA simples e complexos separadamente (tabelas 12 e 13, respectivamente). Novamente não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 11 – Média da idade, do tamanho das lesões e do número de nódulos em pacientes com MOH e LOH

Parâmetro	Idade		Tamanho		Nº de nódulos	
Classe (n)	MOH (79)	LOH (25)	MOH (81)	LOH (27)	MOH (80)	LOH (28)
(Média±DP)	29,10 ±11,779	29,20 ±11,85	29,06 ±12,92	34,78 ±14,04	1,32 ±0,90	2,07 ±3,76
Teste	$t = 0,04$ ; $p=0,97$		$t = 1,95$ ; $p=0,054$		$Z(U) = 1,05$ ; $p=0,29$	

TABELA 12 – Média da idade, do tamanho das lesões e do número de nódulos em pacientes com FA simples e LOH e MOH

Parâmetro	Idade		Tamanho		Nº de nódulos	
Classe (n)	MOH (60)	LOH (20)	MOH (61)	LOH (22)	MOH (60)	LOH (28)
(Média±DP)	28,18 ±11,85	28,95 ±12,32	29,92 ±12,73	33,00 ±9,69	1,13 ±0,394	1,32 ±0,57
Teste	$t = 0,25$ ; $p=0,80$		$t = 1,03$ ; $p=0,30$		$Z(U) = 1,08$ ; $P=0,28$	

TABELA 13 – Média da idade, do tamanho das lesões e do número de nódulos em pacientes com FA complexo e LOH e MOH

Parâmetro	Idade		Tamanho		Nº de nódulos	
Classe (n)	MOH (18)	LOH (5)	MOH (20)	LOH (5)	MOH (20)	LOH (5)
(Média±DP)	33,22 ±10,36	30,20 ±10,94	26,45 ±13,48	42,60 ±26,34	1,9 ±1,55	5,60 ±8,65
Teste	$t = 0,57$ ; $p=0,57$		$t = 1,96$ ; $p=0,06$		$Z(U) = 0,85$ ; $p=0,40$	

#### 6.2.2.2. Fibroadenoma (FA) X Carcinoma (CA)

As frequências de LOH e MOH de cada marcador foram comparadas entre fibroadenomas e carcinomas mamários. Os dados dos carcinomas foram obtidos de um estudo realizado previamente em nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA, 2008) utilizando estes mesmos marcadores de microssatélites. A tabela 14 apresenta a frequência de LOH e MOH observada nos dois tipos de tumores, sendo que para todos os marcadores observou-se uma maior proporção de LOH, estatisticamente

significativa, nos carcinomas. A LOH em pelo menos um loco de 3p foi observada em 28 (25,2%) das 111 pacientes com FA e em 85 (60,3%) das 141 pacientes com carcinomas mamários, sendo a proporção de LOH e MOH estatisticamente diferente entre os tumores ( $\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 29,46$ ;  $p < 0,0001$ ).

TABELA 14 – Comparação de LOH e MOH nos sete marcadores microssatélites em fibroadenomas e carcinomas mamários

Marcador	Tumor	LOH n (%)	MOH n (%)	Qui-Quadrado
<b>1. D3S1274</b>	FA	4 (5,6)	68 (94,4)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 17,05$ ; $p < 0,0001$
	CA	21 (35,6)	38 (64,4)	
<b>2. D3S1079</b>	FA	3 (9,1)	30 (90,9)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 6,02$ ; $p = 0,0141$
	CA	3 (4,0)	89 (96,0)	
<b>3. D3S1300</b>	FA	3 (4,0)	72 (96,0)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 11,08$ ; $p = 0,0009$
	CA	18 (24,3)	56 (75,7)	
<b>4. D3S1581</b>	FA	5 (5,4)	87 (94,6)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 14,13$ ; $p = 0,0002$
	CA	28 (26,4)	78 (73,6)	
<b>5. D3S1286</b>	FA	6 (6,1)	92 (93,9)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 14,66$ ; $p < 0,0001$
	CA	24 (28,2)	61 (71,8)	
<b>6. D3S1263</b>	FA	5 (5,4)	88 (94,6)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 5,73$ ; $p = 0,0167$
	CA	14 (18,2)	63 (81,8)	
<b>7. D3S1307</b>	FA	5 (7,9)	58 (92,1)	$\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 21,02$ ; $p < 0,0001$
	CA	33 (44,6)	41 (55,4)	

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. EPIDEMIOLOGIA

Fibroadenomas (FA) são tumores benignos mamários que ocorrem com maior frequência em mulheres jovens (de 15 a 30 anos de idade), nas quais o câncer de mama é raro. Provavelmente por essa razão, estas lesões tradicionalmente foram interpretadas como não estando relacionadas ao câncer de mama. Entretanto, em diversos estudos tem sido observado que mulheres com FA apresentam risco 2 ou 3 vezes maior de desenvolver carcinoma mamário, dependendo da histopatologia do tumor e da história familiar. Portanto, o diagnóstico positivo para FAs pode identificar mulheres jovens que apresentam um aumento de risco para desenvolver câncer de mama (DUPONT *et al.*, 1994).

FAs exibem uma ampla variedade de aspectos citológicos e histológicos; o componente epitelial pode apresentar desde ausência de atividade hiperplásica até um carcinoma *in situ*. Em nosso estudo 36,1% (n=51) das pacientes apresentaram outras alterações associadas ao FA, podendo estas alterações serem proliferativas (como as hiperplasias) ou fibrocísticas (como a adenose, metaplasia apócrina e fibrose estromal, por exemplo).

O primeiro estudo onde foi realizada uma revisão em detalhes das características histológicas do tecido adjacente e interno de um grande número de fibroadenomas (n=396) foi o de KUIJPER *et al.* (2001). Neste estudo, como observado em nossa amostra, a metaplasia apócrina foi a lesão mais frequente, estando presente em 28,0% (n=111) das pacientes do trabalho citado e em 15,6% (n=22) no nosso estudo. Em nossa amostra, a hiperplasia epitelial típica foi encontrada em 12,8% (n=18) das pacientes, uma frequência menor que a descrita por KUIJPER *et al.* (2001) e CALADO e LIMA (2004), 28% e 26%, respectivamente ( $\chi^2_{(2)} = 13,4$ ;  $p < 0,002$ ). As diferenças nas frequências destas alterações pode ter sido devida as variações da quantidade de parênquima adjacente disponível para análise dos tumores excisados em cada um destes estudos (CALADO e LIMA, 2004).

A presença de componentes de hiperplasia epitelial atípica, carcinoma ductal e lobular *in situ* ou carcinoma invasivo é rara, ocorrendo em torno de 1% dos casos de FAs. A frequência encontrada para as hiperplasias atípicas em nosso trabalho foi

de 1,4% (n=2). DUPONT *et al.* (1994) e KUIJPER *et al.* (2001) observaram 1,7% e 0,3%, respectivamente. O carcinoma intraductal ou carcinoma ductal *in situ* ocorreu em apenas uma paciente de nossa amostra (0,7%) e não observamos a ocorrência de carcinomas invasivos nos FAs analisados.

Outros estudos que descreveram a ocorrência de carcinomas *in situ* e invasivos em fibroadenomas foram o de OZELLO e GUMP (1985) e DESCHENES *et al.* (1985) que encontraram frequências variando de 0,3 a 1%. Ainda é controverso se estas lesões são sincrônicas (se desenvolvem simultaneamente) ou metacrônicas (se desenvolvem em períodos distintos) ao FA. A primeira alternativa, entretanto, parece ser mais provável e pode refletir uma associação genética (suscetibilidade a progressão) entre o epitélio do fibroadenoma e o epitélio adjacente (KUIJPER *et al.*, 2001). Neste sentido, no estudo de KANEKO *et al.* (2002) o componente hiperplásico do FA apresentava alterações genéticas que também ocorriam no carcinoma associado, indicando uma relação genética entre as lesões.

Algumas variações morfológicas concomitantes aos fibroadenomas são descritas como sendo associadas ao estágio de desenvolvimento da glândula mamária da paciente e por isso são mais frequentes em determinadas faixas etárias. Em nosso estudo, foram analisadas em relação a idade das pacientes as 7 alterações histopatológicas mais frequentes: adenose (simples e esclerosante), metaplasia apócrina, fibrose estromal, ectasia ductal, hialinização, hiperplasia epitelial (típica e atípica) e FA juvenil (Tabela 6, Gráfico 1). Quando as pacientes com estas alterações foram comparadas as do grupo que apresentava apenas o fibroadenoma, sem nenhuma outra alteração, todas as médias de idade foram superiores, com exceção dos FA juvenis, embora somente com uma significância estatística para a ectasia ductal ( $p < 0,05$ ). Esta alteração ocorre devido à involução do tecido mamário, com o encurtamento e a dilatação dos ductos grandes e intermediários. É comum o seu aparecimento entre os 30-50 anos de idade, sendo que mais de 40% das mulheres apresentam dilatação ductal quando atingem 70 anos de idade (CODD e GATELEY, 2007).

CALADO e LIMA (2004) realizaram uma revisão da macro e microscopia de 316 casos de fibroadenoma para comparar a distribuição das alterações epiteliais e estromais intratumorais em 163 mulheres jovens (15 a 39 anos de idade) e 153 com idade entre 40 a 79 anos. As características epiteliais indicativas de atividade proliferativa na lesão, como adenose comum, hiperplasia epitelial e metaplasia



apócrina foram encontradas mais frequentemente no grupo de pacientes mais jovens ( $p < 0,05$ ). Já as lesões de natureza involutiva, como epitélio atrófico, calcificação intraductal e estromal e hialinização estromal foram encontradas com maior frequência nas mulheres com mais idade. Estes autores sugeriram que a presença de hialinização estromal, associada à diminuição do tamanho da lesão presentes no grupo de pacientes mais velhas, reflete um *continuum* de alterações regressivas no qual, após o crescimento máximo do tumor haveria início da atividade involutiva na pós-menopausa. Ocorreriam hialinização crescente do estroma e redução do tamanho da lesão, resultando na sua calcificação.

A principal faixa etária de ocorrência do fibroadenoma juvenil ou gigante é entre os 10 aos 18 anos de idade (DOLMANS *et al.*, 2007). Em nosso trabalho as médias de idade entre FA juvenil e apenas FA ( $21,00 \pm 9,57$  e  $29,06 \pm 11,86$ , respectivamente), não apresentaram diferença estatisticamente significativa, provavelmente devido ao pequeno número amostral dos FA juvenis ( $n=5$ ).

Em relação as hiperplasia, KUIJPER *et al.* (2001) não encontraram diferença entre a idade média das pacientes com ou sem hiperplasia, o que também foi observado em nosso trabalho.

DUPONT *et al.* (1994) foram os primeiros a investigar se um subgrupo de pacientes com FA com características histopatológicas específicas apresentaria um aumento de risco particular para ao desenvolvimento de câncer de mama. Estes autores verificaram que tumores que apresentavam cistos maiores que 3 mm, adenose esclerosante, calcificações epiteliais e metaplasia apócrina apresentam um aumento no risco de carcinomas mamários em relação aos grupos controles e aos fibroadenomas simples. A partir deste trabalho, os autores sugeriram que tumores que apresentassem este grupo de lesões fossem denominados “fibroadenomas complexos”. Entretanto, não está claro se estas lesões são ocasionadas por uma causa comum.

Em nossa amostra, 18,44% ( $n=26$ ) foram de FA complexos. Esta frequência é semelhante à encontrada por CALADO e LIMA (2004) (19,0%;  $\chi^2_{(1)} = 0,003$ ;  $p=0,95$ ) e SKLAIR-LEVY *et al.* (2008) (15,7%;  $\chi^2_{(1)} = 0,57$ ;  $p=0,45$ ), entretanto foi menor que a descrita KUIJPER *et al.* (2001) (40,4%,  $\chi^2_{(1)corr.} = 20,3$ ;  $p < 0,0001$ ). Este fato provavelmente pode ser explicado devido a rigorosa revisão da patologia realizada por KUIJPER *et al.* (2001), que utilizou um grande número de lâminas por

caso, o que permitiu identificar uma alta incidência de adenose esclerosante e metaplasia apócrina em suas amostras.

A presença de hiperplasia (típica e atípica) intratumoral e no tecido adjacente foi proporcionalmente superior nos FA complexos (19,22%) do que nos simples (5,22%) (Gráfico 2,  $\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 4,0$ ;  $p < 0,05$ ). DUPONT *et al.* (1994) também investigaram a presença de doença proliferativa no parênquima adjacente de 1804 fibroadenomas e verificaram uma diferença significativa entre FAS e FAC ( $p = 0,002$ ), sendo que 17,8% ( $n=78$ ) dos FAC apresentavam hiperplasia e 12,4% ( $n=169$ ) dos FAS. KUIJPER *et al.* (2001), entretanto, não encontrou associação entre complexidade e hiperplasia no tecido adjacente, porém associação entre a presença de hiperplasia intratumoral ( $p = 0,005$ ) foi observada.

A presença de hiperplasia no parênquima adjacente ao FA determina um aumento de risco para o câncer de mama. MCDIVITT *et al.* (1992) e DUPONT *et al.* (1994), encontraram um aumento de risco relativo variando de 2 a 7 vezes para mulheres apresentando FA com hiperplasia associada, dependendo do grau de atipia da lesão. Segundo KUIJPER *et al.* (2001), é possível que o aumento de risco associado ao FA complexo como descrito por DUPONT *et al.* (1994), seja devido à presença concomitante de alterações hiperplásicas, já que estas estiveram associadas ao FA complexo no estudo citado e também em nosso trabalho.

DUPONT *et al.* (1994) admitem que os diferentes aumentos de risco relativo observados no seu trabalho teriam maior importância clínica para mulheres que apresentam história familiar positiva de câncer de mama. Para estas mulheres, a presença de hiperplasia no parênquima adjacente e de fibroadenoma complexo aumentam ainda mais o seu risco já elevado. Por isso, o diagnóstico destas lesões nestas mulheres deve indicar o acompanhamento mamográfico regular a partir de 35-40 anos de idade. Além disso, a inclusão de uma fração de parênquima adjacente durante a remoção do FA seria apropriada para possibilitar o diagnóstico destas lesões.

Apesar de a definição de fibroadenomas simples e complexos proposta por DUPONT *et al.* (1994) estar sendo utilizada por diversos investigadores, esta ainda não foi validada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e não aparece no *World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. No Brasil esta classificação foi citada em publicação do Ministério da Saúde: *Diagnóstico Histopatológico e Citopatológico das Lesões da*

*Mama* (CALADO e LIMA 2004), e embora estas lesões apresentem um aumento de risco para o carcinoma mamário (DUPONT *et al.*, (1994), poucas investigações diferenciam as características histopatológicas deste tipo de lesão em relação aos demais fibroadenomas.

Em nosso estudo, fibroadenomas complexos foram mais frequentes em mulheres com mais idade ( $t = 2,00$ ;  $p < 0,05$ ) o que também havia sido observado por KUIJPER *et al.* (2001) ( $p = 0,009$ ) e SKLAIR-LEVY *et al.* (2008) ( $p < 0,001$ ). Este resultado pode ser explicado por um maior tempo necessário para que as alterações histopatológicas que definem FA complexo se desenvolvam (SKLAIR-LEVY *et al.*, 2008). O número de nódulos foi maior em pacientes com fibroadenomas complexos do que nas com FA simples, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $Z(U) = 2,80$ ;  $p < 0,005$ ). Já o tamanho tumoral não apresentou em média diferença estatisticamente significativa entre as 2 lesões ( $t = 0,39$ ;  $p = 0,70$ ), diferente do observado por SKLAIR-LEVY *et al.* (2008), que descreveram que FA complexos apresentavam, em média, metade do tamanho tumoral dos FA simples ( $p < 0,001$ ).

A influência da idade no aspecto histológico do fibroadenoma é bem conhecida, sobretudo quanto à tendência de redução do diâmetro e calcificação estromal nas mulheres mais idosas (CALADO e LIMA, 2004), no entanto os estudos que avaliaram a regressão e desaparecimento do tumor em relação à idade da paciente não diferenciaram os fibroadenoma simples dos complexos.

Em nosso trabalho observamos um comportamento diferente destas lesões em relação à regressão tumoral ocasionada pela idade. No caso dos FA simples observou-se um valor de **b** negativo estatisticamente significativo (**b** = -0,24;  $t = 2,00$ ;  $p = 0,048$ ; IC 95% = -0,47 a -0,001), indicando que este tipo de lesão sofre regressão de tamanho em função do aumento de idade das pacientes. Entretanto, os fibroadenomas complexos não apresentaram este padrão de diminuição do tamanho do tumor em relação à idade, pois o coeficiente de regressão apresentou um valor positivo e estatisticamente não significativo (**b** = 0,37;  $t = 1,07$ ;  $p = 0,29$ ; 95% IC = -0,338 a 1,069). Estas informações, devido a sua relevância, devem ser reavaliadas principalmente em estudos compostos por tamanhos amostrais maiores.

TAKEI *et al.* (1999) utilizando uma amostra de 58 casos de fibroadenomas, sem diferenciá-los em relação à patologia, encontrou uma dependência das variações do tamanho dos tumores em função da idade da paciente, verificando que o tamanho do FA (Y) decrescia significativamente com a idade (X), ( $p = 0,0013$ ), de

acordo com a equação  $Y = -0,340X + 27,0$  (95% IC -0.139 a -0.540). Em relação aos FA complexos, SKLAIR-LEVY *et al.* (2008) avaliaram 21 pacientes com seguimento médio de 24 meses e verificaram que a massa tumoral permaneceu com tamanho constante nos exames mamográficos e ultra-sonográficos.

Baseando-se em seus resultados, TAKEI *et al.* (1999) propuseram que a maioria dos FAs deve parar de crescer quando atingem 20 mm no diâmetro máximo, permanecendo estáticos ou regredindo. O declínio anual médio de -0,340 mm do tamanho do tumor descrito neste estudo sugere que raramente os FAs regredem rapidamente. Considerando um FA de tamanho igual a 20 mm que comece a regredir, seriam necessários aproximadamente 58 anos –  $20 \text{ mm} / 0,34 \text{ mm}$  – para a regressão total. Nossos resultados corroboram com o lento declínio do tamanho tumoral, sendo que encontramos uma redução média anual de -0,24 mm. Por este motivo e de acordo com a estimativa acima, muitas vezes não é possível reconhecer a redução do tamanho tumoral em um curto intervalo de acompanhamento conservativo, assim a maioria dos tumores é descrita como permanecendo estática durante o acompanhamento clínico (CARTY *et al.*, 1995).

Em nosso estudo, outras análises também evidenciaram diferenças no comportamento de FA simples e complexos. Na avaliação da dependência das variações do número de nódulos em função da idade das pacientes, os FA simples apresentaram uma dependência negativa, estatisticamente significativa (**b** = -0,0123;  $t = 2,73$ ;  $p = 0,0075$ ; IC 95% = -0,021 a -0,003), indicando que pacientes de menor idade apresentam um maior número de nódulos. O mesmo não se observou nos FA complexos; embora o valor de **b** também tenha sido negativo, o mesmo não apresentou significância estatística (**b** = -0,59;  $t = 0,59$ ;  $p = 0,56$ ; 95% IC = -0,171 a 0,095). Estes resultados podem ser devidos à regressão tumoral que ocorre em fibroadenomas simples e não é observada nas lesões complexas, o que poderia resultar no desaparecimento dos nódulos em pacientes com idade mais elevadas com FA simples.

A análise da interdependência das variações do tamanho tumoral e do número de nódulos demonstrou que nos FA simples não existe uma correlação estatisticamente significativa entre estes parâmetros. Entretanto, os FA complexos apresentaram uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre as variáveis ( $r = 0,66$ ;  $t = 4,69$ ;  $p < 0,0001$ ; 95% IC = 0,39 a 0,82). Segundo o nosso

conhecimento não existem informações na literatura sobre esta análise, ficando, portanto, inviável avaliar os nossos dados com outros já descritos.

A história natural dos fibroadenomas não é completamente compreendida e a conduta terapêutica destas lesões é controversa. Alguns estudos (DENT e CANT, 1989 e WILKINSON *et al.*, 1989) revelaram que a maioria das pacientes com nódulos palpáveis prefere a remoção cirúrgica. ALLE *et al.* (1996) descreveu que a remoção do tumor causa morbidade mínima, permite a completa análise da patologia, tem uma alta aceitação das pacientes e resulta em uma taxa de cura de 100%. Entretanto, outros estudos como o de CARTY *et al.* (1995) demonstraram que FAs permanecem estáveis ou regredem de tamanho, sendo o tratamento conservativo seguro e aceitável. Muitos autores optam pelo acompanhamento conservativo de acordo com a idade das pacientes, embora a idade não tenha sido definida, já foram sugeridos como limites 25, 35 e 40 anos de idade. Quando o FA é tratado conservativamente, um diagnóstico definitivo não é estabelecido, e diversos tumores clinicamente diagnosticados como fibroadenomas foram depois confirmados patologicamente como sendo outras lesões benignas (TAKEI *et al.*, 1999; KUIJIPER *et al.*, 2001). No estudo de DENT e CANT (1989) em uma série de 321 tumores com diagnóstico clínico inicial de FA, apenas 218 (68%) foram confirmados histologicamente como fibroadenomas.

Segundo TAKEI *et al.* (1999), os fibroadenomas devem ser monitorados conservativamente, entretanto, se o tumor continuar aumentando de tamanho durante o acompanhamento clínico ou se ele possuir mais de 30 mm de diâmetro, eles devem ser removidos devido à possibilidade de representarem outras formas de doenças da mama.

Em um trabalho recente, SKLAIR-LEVY *et al.* (2008) sugerem que devido à baixa incidência de malignização e ausência de crescimento durante o acompanhamento clínico, os FA complexos podem ser tratados com uma abordagem conservativa, semelhante à recomendada para os FA simples. Porém outros estudos devem ser realizados para avaliar esta sugestão.

Para KUIJIPER *et al.* (2001), existem dois problemas que devem ser avaliados para a definição do tratamento dos fibroadenomas. Primeiro, o estroma e o epitélio da lesão podem sofrer transformação maligna. Estes autores encontraram carcinoma *in situ* dentro de FA em seis pacientes com idade acima de 40 anos. Portanto, a remoção de FA em mulheres com mais de 35 anos de idade resolveria o

problema da progressão epitelial. Segundo, FA está associado a risco a longo prazo de desenvolvimento de câncer invasivo, dependendo da presença de hiperplasia no tecido adjacente, complexidade do FA e da história familiar. Entretanto, enquanto não estiver claro se o risco relativo indicado é alto o suficiente para ter consequências no procedimento clínico como acompanhamento clínico intensivo e quimioprevenção, não existem argumentos fortes para recomendar a remoção de todos os fibroadenomas. Há ainda o fato de que o risco relativo associado com estas lesões parece ser bilateral e não específico para a mama onde ocorreu o FA, assim a remoção cirúrgica da lesão não diminuiria o risco de desenvolvimento do carcinoma (KUIJPER *et al.*, 2001).

Independente do tipo de fibroadenoma diagnosticado, as pacientes devem ser informadas sobre a história natural do FA, considerando as suas características histológicas específicas, para que possam compreender e avaliar o grau de risco bem como as vantagens e desvantagens da intervenção cirúrgica, para que estas adquiram as informações necessárias para a escolha consciente e informada do procedimento terapêutico a ser adotado (TAKEI *et al.*, 1999).

## 7.2. PERDA DE HETEROZIGOSE

A perda de regiões cromossômicas é uma das alterações mais frequentemente observadas no câncer de mama (MIYAKIS e SPANDIDOS, 2002) sendo de importância para a localização de genes supressores de tumor. As análises de LOH combinadas às análises de alterações histopatológicas podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão dos tumores mamários e no desenvolvimento de novos marcadores moleculares para uso clínico. Segundo PEREZ-ORDOÑEZ *et al.* (2006), a análise de LOH, conjuntamente com outros marcadores pode ser um importante fator na predição de risco de progressão tumoral quando se avalia lesões pré-cancerosas, desenvolvimento de tumores secundários e óbito.

A perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 (3p) é frequentemente observada em carcinomas mamários e em diversos tumores epiteliais humanos (YAMAMOTO *et al.*, 2007) indicando a localização de genes supressores de tumor com importante função na carcinogênese. Diversos estudos de LOH e citogenética demonstraram uma variedade de perdas nessa região em

câncer de mama e em alguns casos, também foram detectadas alterações em lesões precursoras e benignas, o que sugere que perdas em 3p devem ocorrer em estágios patológicos iniciais do desenvolvimento do câncer de mama (EUHUS *et al.*, 1999; MAITRA *et al.*, 2001). Pelo menos 3 regiões distintas em 3p foram identificadas por apresentarem perdas alélicas frequentes em tumores de mama: 3p24-26, 3p21.3-22 e 3p14.2,22-25, o que indica a existência de diversos genes supressores de tumor localizados em 3p (MAITRA *et al.*, 2001).

Em relação às doenças benignas da mama, WASHINGTON *et al.* (2000) avaliaram 14 microssatélites em regiões já descritas como apresentando LOH em câncer de mama (3p, 9p, 11p, 13q, 16q, 17p, e 17q) em componentes celulares microdissectados de 32 alterações fibrocísticas mamárias. Foram encontradas perdas alélicas em 22% (6/27) das unidades ducto-lobulares terminais normais, 17% (4/23) das adenoses, 19% (4/21) das hiperplasias e 53% (10/19) das metaplasias apócrinas. Entre os casos analisados, três metaplasias e uma hiperplasia ductal apresentaram LOH em 3p. Devido à alta frequência de LOH encontrada nas metaplasias apócrinas, estes autores revisaram 14 casos em que essas lesões ocorriam adjacentes a carcinomas e em 7 deles observaram que ambas apresentavam perdas concordantes em um ou mais marcadores, sendo que em uma paciente foi observada perda em 3p em ambas as lesões. Os autores (WASHINGTON *et al.*, 2000) concluem que a LOH nesta região pode ocorrer no desenvolvimento normal ou hiperplásico das células epiteliais mamárias e que a semelhança dos padrões de LOH da metaplasia apócrina e dos carcinomas adjacentes sugerem um precursor clonal comum para estas lesões.

Em relação aos fibroadenomas (FA), resultados descritos na literatura indicam que alterações como a perda de heterozigose e instabilidade de microssatélite ocorrem nessas lesões, porém com baixa incidência. Em nosso estudo, foram observadas perdas de heterozigose nos sete locos analisados, variando de 4,0% para o marcador D3S1300 a 9,1% para o marcador D3S1079. Considerando-se que as frequências de LOH e MOH distribuíram-se homogeneamente entre os marcadores ( $p=0,95$ ) e que as perdas ocorreram com baixa frequência em todos os locos, não é possível, a partir de nossos resultados, sugerir uma região ou um gene específico em 3p que estejam envolvidos na patogênese do fibroadenoma.

MCCULLOCH *et al.* (1998) analisaram 11 marcadores polimórficos em várias regiões cromossômicas em 39 casos de FA e a perda alélica foi observada em 10% dos casos, sendo que uma paciente (2,6%) apresentou LOH em um marcador localizado em 3p21-14.2 (D3S1514). FRANCO *et al.* (2003) também utilizaram 11 marcadores, sendo 3 deles localizados em 3p (3p21-14.3, 3p24 e 3p24-22). Estes autores avaliaram a LOH em fibroadenomas de dois grupos de pacientes: um que apresentou carcinoma na mesma mama após ou concomitantemente ao aparecimento do FA (n=32), e um grupo controle com FA sem a incidência de carcinoma (n=26). Apenas dois casos apresentaram LOH em 2 marcadores, um deles localizado em 3p (D3S1514), sendo que ambos eram do primeiro grupo e apresentavam um carcinoma ductal *in situ* (CDIS) ocorrendo dentro do FA. Entretanto estes autores não avaliaram a presença dessas alterações no carcinoma invasivo sincrônico e, portanto, não puderam estabelecer uma relação genética entre as lesões. No estudo de KANEKO *et al.* (2002), por sua vez, foi observado que em dois casos de DCIS associado ao fibroadenoma, o componente hiperplásico presente no FA provavelmente era de natureza pré-neoplásica, pois apresentava LOH nos mesmos marcadores que o carcinoma associado.

Em um estudo recente WANG *et al.* (2006) realizaram uma análise utilizando microarranjos de SNPs (polimorfismos de base única) para obter um mapa de LOH em todo o genoma de tumores filodes e fibroadenomas. A perda alélica foi observada em todos os casos de tumores filodes analisados (n=15), porém com uma ampla variação na frequência e nos locais de perda. Em contraste, os fibroadenomas (n=13) apresentaram ausência ou uma baixa frequência de LOH, sendo que apenas 1 amostra apresentou LOH em duas regiões localizadas em 3p (3p21 e 3p14). Estes autores observaram ainda que tumores filodes primários e recorrentes da mesma paciente compartilhavam regiões de LOH. Entretanto, fibroadenomas metacrônicos da mesma paciente (n=2) apresentavam padrões de LOH distintos, indicando uma origem genética independente e não relacionada para os múltiplos FAs que se desenvolveram nestas pacientes.

Em relação à histopatologia do tumor, nossos resultados demonstraram que a distribuição de LOH em pelo menos um marcador e MOH foi homogênea entre pacientes com FA simples e complexo e também entre pacientes com hiperplasia associada ao FA e sem hiperplasia. Estes resultados sugerem que deleções em 3p



não estão relacionadas à complexidade da lesão ou ao grau de hiperplasia do epitélio.

A comparação das médias dos parâmetros clínicos (idade da paciente) e histopatológicos (tamanho do tumor e número de nódulos) entre pacientes com LOH e MOH, também não apresentou diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que estes parâmetros não apresentam relação com a LOH em 3p. Apenas a análise da diferença entre as médias dos tamanhos tumorais ficou próxima ao limite de significância ( $p=0,054$ ), e estudos com tamanhos amostrais maiores são necessários para confirmar ou refutar a informação que FAs com perdas alélicas nesta região apresentam maior tamanho tumoral.

Existem poucos estudos moleculares disponíveis na literatura sobre fibroadenomas e a maioria deles objetiva responder questões sobre a frequência de anormalidades genéticas e a relação de clonalidade dos componentes epitelial e estromal e entre essas lesões e carcinomas associados (TSE e TAN, 2005). Além disso, a maioria dos estudos apresenta um pequeno número amostral e não considera os parâmetros histológicos e clínicos na análise, dificultando a comparação de nossos resultados com estes dados disponíveis na literatura.

Em nosso estudo comparamos as frequências observadas de LOH e MOH entre fibroadenomas e em carcinomas mamários. Os dados dos carcinomas foram obtidos de um estudo realizado previamente em nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA, 2008). Em todos os sete marcadores observou-se uma maior proporção de LOH estatisticamente significativa nos carcinomas ( $p$  variando de 0,0167 a  $<0,0001$ ). Quando todos os marcadores foram avaliados em conjunto, 28 (25,2%) pacientes com FA apresentaram LOH em pelo menos um dos sete locos analisados, sendo a proporção de LOH estatisticamente superior nos carcinomas ( $\chi^2_{(1)}\text{corr.} = 29,46$ ;  $p<0,0001$ ). KANEKO *et al.* (2002) encontraram frequências semelhantes de perdas alélicas na análise de hiperplasias epiteliais de tecido não-neoplásico de pacientes com carcinomas ( $n=35$ ) e com fibroadenomas ( $n=29$ ). Estes autores avaliaram sete locos de microssatélites nas regiões 16q, 17p, 17q e 18q. A frequência de LOH observada foi menor nos casos com fibroadenomas (21%) que nos casos com carcinomas (63%) ( $p<0,01$ ), sendo que apenas nos carcinomas a frequência de perda estava diretamente relacionada com grau da hiperplasia. Baseados em seus resultados os autores sugerem que o nível de alterações genéticas difere entre hiperplasias associadas a carcinomas e a fibroadenomas.

Apesar do rigor destas considerações, deve-se considerar que quando analisamos a presença de LOH em pelo menos um loco na região 3p observamos uma frequência de 25,2%, o que indica a deleção de marcadores moleculares provavelmente com importância para os eventos iniciais da tumorigênese mamária.

As altas frequências de LOH descritas em carcinomas mamários por OLIVEIRA (2008) e outros estudos, em todas as sub-regiões de 3p estudadas neste trabalho, sugerem a existência de genes supressores de tumor com função relevante na etiologia e progressão dos carcinomas de mama, como os genes *VHL*, *FANCD2*, *THRB*, *RARB*, *RBM5*, *BAP1*, *RASSF1*, *FHIT* e *ROBO1*. Conforme os resultados de nosso trabalho e outros da literatura, sugerimos que a LOH nesta região não é uma alteração importante na etiologia do fibroadenoma, podendo haver outros mecanismos, como a hipermetilação da região promotora de genes supressores de tumor, responsáveis pelo desenvolvimento destas lesões. Métodos complementares à análise de DNA, como estudos de expressão de RNA mensageiro e proteínas são importantes para corroborar os resultados de LOH e compreender o desenvolvimento e biologia dos fibroadenomas.

Devido à grande variação do número e do tipo de marcador de microssatélite utilizado nos diversos estudos descritos na literatura, torna-se difícil a comparação dos resultados obtidos. Algumas considerações devem incluir: o número de microssatélites utilizados (quanto maior o número de microssatélites utilizados, maior a chance de um caso ser positivo para perda alélica), o tamanho da amostra (as diferentes frequências encontradas podem ser devidas ao pequeno número de casos avaliados na maioria dos estudos) e as diferentes técnicas empregadas nestas análises (MCCULLOCH *et al.*, 1998). Os estudos de MCCULLOCH *et al.* (1998) e KANEKO *et al.* (2002), por exemplo, utilizaram a técnica de PCR e análise dos produtos em gel de poliacrilamida. FRANCO *et al.* (2003), por sua vez, utilizou a mesma técnica utilizada neste trabalho, PCR visualizada em sequenciador automático de DNA. Esta última metodologia é a mais utilizada atualmente por ser mais sensível e, portanto, mais precisa, possibilitando a detecção de alterações alélicas mesmo quando há uma quantidade limitada de DNA para análise ou contaminação com outros tipos celulares (EDWARDS e BARTLETT, 2003).

Apesar de diversos trabalhos encontrados na literatura descreverem perdas alélicas em muitas regiões cromossômicas de diversos tipos de tumores, poucos grupos conseguiram validar a existência de genes supressores de tumor localizados

nessas regiões. TOMLINSON *et al.* (2002) avaliando o motivo das dificuldades e limitações nos estudos de LOH, apontaram como principal problema o fato de que os estudos citogenéticos demonstram uma alta frequência de aneuploidias, poliploidias e cariótipos complexos que muitas vezes são incompatíveis com a hipótese dos dois eventos de KNUDSON (1971). Em relação aos problemas metodológicos, uma crítica recorrente dos estudos moleculares é que além da presença de alta heterogeneidade tumoral no tecido mamário, a frequente presença de tecido normal na amostra pode “mascarar” os clones tumorais anormais. Métodos de microdissecção celular podem solucionar estes problemas, porém, deve-se ter cuidado durante este procedimento em relação à seleção da região do tecido a ser microdissectada, a fim de não se perder regiões tumorais que possam conter alterações clonais e portanto representativas da lesão (TOMLINSON *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2003). Com o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de microdissecção a laser, no entanto, este problema foi praticamente eliminado (EMMERT-BUCK *et al.*, 1996; FULLER *et al.*, 2003).

A possibilidade de detectar lesões precursoras de neoplasias invasivas é de grande importância do ponto de vista diagnóstico, prognóstico e terapêutico. No câncer de mama (e outras malignidades como no câncer de ovário, por exemplo) o modelo de progressão bem definido proposto para o carcinoma colorretal (VOGELSTEIN E KINZLER, 1993) não pode ser aplicado porque pouco se conhece sobre a história natural da doença. Até o momento, evidências favorecendo uma relação direta entre lesões benignas e malignas se basearam apenas em características histológicas, onde se vê uma coexistência e um *continuum* entre essas lesões (THOMPSON *et al.*, 2008). Outras evidências, embora indiretas, foram obtidas de estudos epidemiológicos como os de MCDIVITT *et al.* (1992), DUPONT *et al.* (1994), e HARTMANN *et al.* (2005) que mostraram um aumento do risco de desenvolver câncer de mama em mulheres com fibroadenomas, hiperplasias usuais, atípicas e carcinomas *in situ*. Entretanto, estudos citogenéticos e moleculares em tumores benignos indicam a presença de alterações específicas que também podem estar presentes em carcinomas invasivos (TIBILETTI *et al.*, 2000). Obter a cronologia dessas alterações em diferentes subtipos de tumores mamários seria um grande avanço, pois se conhecendo as vias de sinalização envolvidas na tumorigênese pode-se desenvolver tratamentos mais direcionados e efetivos (THOMPSON *et al.*, 2008).

Concluindo, deve-se enfatizar que embora os dados apresentados neste trabalho e em outros da literatura em tumores benignos de mama não sejam sugestivos de que a perda de heterozigose seja um mecanismo relevante para origem e progressão destas lesões, a simples presença da mesma, mesmo que em frequências baixas, é uma informação que deve ser interpretada com maior significância científica. Estudos com pacientes que apresentem seguimento clínico prolongado, múltiplos nódulos e recorrência tumoral são importantes para compreender as relações genéticas e a história natural das lesões benignas. Como acima nos referimos, a possibilidade de detectar lesões precursoras de neoplasias invasivas é de grande importância para o diagnóstico, com repercussões prognósticas e terapêuticas.

## 8. CONCLUSÃO

1. Os fibroadenomas complexos, comparados com os simples, estão associados a uma evolução clínica das pacientes mais desfavorável. Esta afirmativa é constatada devido a observação nos fibroadenomas complexos de:

- maior frequência de hiperplasia associada;
- maior média de idade das pacientes;
- maior número de nódulos;
- ausência de regressão do tamanho tumoral e redução do número de nódulos em função da idade;
- interdependência entre as variações do tamanho tumoral e do número de nódulos.

Portanto, os resultados obtidos podem apresentar consequências no tratamento deste subgrupo de pacientes com fibroadenoma complexo, o qual deve ser reavaliado, considerando que o procedimento terapêutico conservativo pode não ser o mais adequado para pacientes portadoras destes tumores.

2. As baixas frequências de LOH detectadas em cada marcador analisado em nossa amostra sugerem que perdas alélicas nesta região (3p) não são um mecanismo com grande significância na tumorigênese do fibroadenoma. No entanto, a relevância da LOH em fibroadenomas não deve ser subestimada. Análises em estudos mais consistentes quanto à homogeneidade dos subtipos histológicos, ao tamanho amostral e à metodologia, com a utilização de amostras microdissectadas, devem ser realizadas para uma melhor avaliação do significado da perda de heterozigose nos diversos componentes das lesões benignas mamárias.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, 20, 1393-1408, 2000.
- AHMADIAN, M.; WISTUBA, I. I.; FONG, K. M.; BEHRENS, C.; KODAGODA, D.R.; SABOORIAN, M. H.; SHAY, J.; TOMLINSON, G. E.; BLUM, J.; MINNA, J. D.; GAZDAR, A. F. Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. **Cancer Res**, 57, 3664-3668, 1997.
- ALLE, K. M.; MOSS, J.; VENEGAS, R. J.; KHALKHALI, I.; KLEIN, S. R. Conservative management of fibroadenoma of the breast. **Br J Surg**, 83, 992-993, 1996.
- ALLRED, D.C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alphapositive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Res**, 6, 240-245, 2004.
- ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. Nuclear receptors in cell life and death. **Trends Endocrinol Metab**, 12, 460-468, 2001.
- BÁNKFALVI, A.; LUDWIG, A.; HESSELLE, B.; BUERGER, H.; BUCHWALOW, I. B.; BOECKER, W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. **Mod Pathol**, 17, 1051-1061, 2004.
- BARBOSA, M. L.; RIBEIRO, E. M. S. F.; SILVA, G. F.; MACIEL, M. E.; LIMA, R. S.; CAVALLI, L. R.; CAVALLI, I. J. Cytogenetic findings in phyllodes tumor and fibroadenomas of the breast. **Cancer Genet Cytogenet**, 154, 156- 159, 2004.
- BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **Methods Mol Biol**, Vol. 226: PCR Protocols, Segunda Edição, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003.
- BARROSO, E.; MILNE, R.L.; FERNANDEZ, L.P.; ZAMORA, P.; ARIAS, J.I.; BENITEZ, J.; RIBAS, G. FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. **Carcinogenesis**, 27, 9, 1930-1937, 2006.
- BARRY, R.E.; KREK, W. The von Hippel-Lindau tumour suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumourigenesis. **Trends in Molecular Medicine**, 10, 466-472, 2004.
- BATEMAN, A. C. Breast Pathology. **Surgery (Oxford)**, 25, 245-250, 2007.
- BEATSON, G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. **Lancet**, 2, 104-207, 1896.
- BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polimerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific

oligonucleotide probes (SSOP). In CHARRON, D. HLA Genetic diversity of HLA: functional and medical implication. **EDK**, 1997.

BISHOP, J. M. Viral Oncogenes. **Cell**, 42, 23-38, 1985.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, 235, 305-311, 1987.

BURBANO, R. R.; LIMA, E. M.; KHAYAT, A. S.; BARBIERI NETO, J.; CABRAL, I. R.; BASTOS JR., L.; BAHIA, M. O.; CASARTELLI, C. Cytogenetic description of breast fibroadenomas: alterations related solely to proliferation? **Braz J Med Biol Res**, 34, 1003-1006, 2001.

CALADO, S. S.; LIMA, M.C.C.A. Estudo morfológico dos fibroadnomas de mama: uma análise comparativa entre grupos etários. **Bras Patol Med Lab**, 40, 6, 411-419, 2004.

CANT, P.J.; MADDEN, M.V.; COLEMAN, M.G.; DENT, D.M. Nonoperative management of breast mass diagnosed as fibroadenoma. **Br J Surg**, 1,82, 792–794, 1995.

CARTY, N. J.; CARTER, C.; RUBIN, C.; RAVICHANDRAN, D.; ROYLE, G. T.; TAYLOR, I. Management of fibroadenoma of the breast. **Ann R Coll Surg Engl**, 77,127-301, 1995.

CAVALIERI, E.; FRENKEL, E.; LIEHR, J.G.; ROGAN, E. R.; ROY, D. Chapter 4: Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents—DNA Adducts and Mutations. **J Natl Cancer Inst Monographs**, 27, 75-93, 2000.

CAVALLI, L. R.; CORNELIO, D. A.; WUICIK, L.; SCHMID-BRAZ, A. T.; RIBEIRO, E. M. S. F.; LIMA, R. S.; URBAN, C. A.; ROGATTO S. R.; CAVALLI I. J. Clonal chromosome alterations in fibroadenomas of the breast. **Cancer Genet Cytogenet**, 131, 120-124, 2001.

CAVALLI, L. R.; CORNELIO, D. A.; LIMA, R. S.; C, URBAN, C. A.; RONE, J. D.; CAVALLI I. J.; BASEM, R. H. Lack of DNA copy number alterations revealed with comparative genomic hybridization in fibroadenomas of the breast. **Cancer Genet Cytogenet**, 153, 173-176, 2004.

CLARKE, M.F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, 124(6), 1111-1115, 2006.

COOD, R.; GATELEY, C. A. Management of benign disease of the breast. **Surgery**, 25, 6, 264-267, 2007.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. **Bost, Jon and Bar Publishers**, 1994.

COURTILLOT, C.; PLU-BUREAU, G.; BINART, N.; BALLEYGUIER, C.; SIGAL-ZAFRANI, B.; GOFFIN, V.; KUTTENN, F.; KELLY, P. A.; TOURAINE, P. Benign Breast Diseases. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 10, 325-335, 2005.

DENT, D.M.; CANT, P.J. Fibroadenoma. **World J Surg**, 13, 706–710, 1989.

DESCHENES, L.; JACOB, S.; FABIA, J.; CHRISTEN, A. Beware of breast fibroadenomas in middle-aged women. **Can J Surg**, 28, 372–374, 1985.

DIXON, J.M.; DOBIE, V.; LAMB, J.; WALSH, J.S.; CHETTY, U. Assessment of the acceptability of conservative management fibroadenoma of the breast. **Br J Surg**, 83, 2, 264–265, 1996.

DOLMANS, G. H. C. G.; HOOGBERGEN, M. M.; van RAPPARD, J. H. A. Giant fibroadenoma of one breast: Immediate bilateral reconstruction. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, 60, 1156-1157, 2007.

DONTU, G.; AL-HAJJ, M.; ABDALLAH, W.M.; CLARKE, M.F.; WICHA, M.S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell proliferation**, 36 (Suppl. 1), 59-72, 2003.

DUPONT, W. D.; PAGE, D. L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. (abstract) **N Engl J Med**, 312, 146-151, 1985.

DUPONT, W. D.; PAGE, D. L.; PARL, F. F.; VNENCAK-JONES, C. L.; PLUMMER, W. D.; RADOS, M. S.; SCHUYLER, P. A. Long-Term Risk of Breast Cancer in Women with Fibroadenoma. **N Engl J Med**, 331, 10-15, 1994.

EDWARDS, J.; BARTLETT, J.M. Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity using DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor material by fluorescence-based multiplex microsatellite PCR. **Methods Mol Biol**, Vol. 226, 301–308, 2003.

EL-WAKEEL, H.; UMPLEBY, H. C. Systematic review of fibroadenoma as a risk factor for breast cancer. **Breast**, 12, 5, 302-307, 2003.

EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R. F.; SMITH, P. D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection, 8; 274(5289), 998-1001, 1996.

EUHUS, D. M.; MAITRA, A.; WISTUBA, I. I.; ALBERTS, A.; ALBORES-SAAVEDRA, J.; GAZDAR, A. F. Loss of heterozygosity at 3p in benign lesions preceding invasive breast cancer. **J Surg Res**, 83, 13-18, 1999.

FRANCO, N.; ARNOULD, L.; MEGE, F.; PICAR, S. F.; ARVEUX, P.; LIZARD-NACOL, S. Comparative analysis of molecular alterations in fibroadenomas associated or not with breast cancer. **Arch Surg**, 138, 291-295, 2003.

FULLER, A. P.; PALMER-TOY, D.; ERLANDER, M. G.; SGROI, D. C. Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 8(3), 335-45, 2003.



GARNIS, C.; BUYS, T. P.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol Cancer**, 3, 9, 2004.

GATALICA, Z.; LELE, S.M.; RAMPY, B.A.; NORRIS, B.A. The expression of FHIT protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. **Cancer**, 88, 6, 1378-1383, 2000.

GOEHRING, C.; MORABIA, A. Epidemiology of benign breast disease, with special attention to histologic types. **Epidemiol Rev**, 19, 310-27, 1997.

GORDON, H. Oncogenes. **Mayo Clin Proc**, 60, 697-713, 1985.

GREENBERG, R.; SKORNICK, Y.; KAPLAN, O.; Management of Breast Fibroadenomas. **J Gen Intern Med**, 13, 9, 64-645, 1998.

GURAY, M.; SAHIN, A. A. Benign Breast Diseases: Classification, Diagnosis, and Management. **Oncologist**, 11, 435-449, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, 57-100, 2000.

HANBY, A.M.; KELSELL, D.P.; POTTS, H.W. Association between loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 and morphological attributes of sporadic breast cancer. **Int J Cancer**, 88, 204–208, 2000.

HARTMANN, L. C.; SELLERS, T. A.; FROST, M.H.; LINGLE, W. L.; DEGNIM, A. C.; GHOSH, K.; VIERKANT, R. A.; MALONEY, S. D.; PANKRATZ, V. S.; HILLMAN, D. W.; SUMAN, V. J.; JOHNSON, J.; BLAKE, C.; TLSTY, T.; VACHON, C. M.; MELTON III, L. J.; VISSCHER, D. W. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. **N Engl J Med**, 353, 229-237, 2005.

HEJNA, J. A.; TIMMERS, C. D.; REIFSTECK, C.; BRUUN, D. A.; LUCAS, L. W.; JAKOBS, P. M.; TOTH-FEJEL, S.; UNSWORTH, N.; CLEMENS, S. L.; GARCIA, D. K.; NAYLOR, S. L.; THAYER, M. J.; OLSON, S. B.; GROMPE, M.; MOSES, R. E. Localization of the Fanconi anemia complementation group D gene to a 200-kb region on chromosome 3p25.3. **Am J Hum Genet**, 66, 1540-1551, 2000.

HUGHES, L. E.; MANSEL, R. E.; WEBSTER, D. J. T. Aberrations of normal development and involution (ANDI): a new perspective on pathogenesis and nomenclature of benign breast disorders. **Lancet**, 2, 1316-1319, 1987.

HUGHES, L.E. Benign Breast Disorders Introduction Fibrocystic Disease? Nondisease? Or ANDI? **World J Surg**, 13, 667-668, 1989.

HUGHES, L.E.; MANSEL, R.E.; WEBSTER, D.J.T. Benign disorders and diseases of the breast—concepts and clinical management. **W.B. Saunders**, 2, 7–20, 2000.

HUNG, J.; KISHIMOTO, Y.; SUGIO, K.; VIRMANI, A.; MCINTIRE, D. D.; MINNA, J. D.; GAZDAR, A. F. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. **J Am Med Assoc**, 273, 1908,1995.

IGLESIAS, A.; ARIAS, M.; SANTIAGO, P.; RODRÍGUEZ, M.; MAÑAS, J.; SABORIDO, C. Benign Breast Lesions that Simulate Malignancy: Magnetic Resonance Imaging with Radiologic–Pathologic Correlation. **Curr Probl Diagn Radiol**, 6, 66-82, 2007.

JONES, C.; DAMIANI, S.; WELLS, D.; CHAGGAR, R.; LAKHANI, S. R.; EUSEBI, V. Molecular Cytogenetic Comparison of Apocrine Hyperplasia and Apocrine Carcinoma of the Breast. **Am J Pathol**, V. 158, No. 1, 2001.

JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer epigenetics comes of age, **Nature Genetics**, 21, 163-167, 1999.

KANEKO, M.; ARIHIRO, K.; TAKESHIMA, Y.; FUJII, S.; INAI, K. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in epithelial hyperplasia of the breast **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, 2 , 9-18, 2002.

KASAMI, M.; VNENCAK-JONES, C. L.; MANNING, S.; DUPONT, W. D.; JENSEN R.; PAGE, D. L. Monoclonality in fibroadenomas with complex histology and phyllodal features. **Breast Cancer Res Treat**, Vol. 50, No 2, 185-191, 1998.

KNUDSON, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci**, 68, 4, 820-823, 1971.

KUIJPER, A.; MOMMERS, E.; VAN DER WALL, E.; VAN DIEST, P. J. Histopathology of fibroadenoma of the breast. **Am J Clin Pathol**, 115, 736–742, 2001.

LA ROSA, S.; SESSA, F.; COLOMBO, L.; TIBILETTI, M. G.; BURLAN, D.; CAPELLA, C. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. **J Clin Pathol**, 54, 37–41, 2001.

LARSON, P. S.; MORENAS, A.L.; BENNETT, S.R.; CUPPLES, A.; ROSENBERG, C. L. Loss of Heterozygosity or Allele Imbalance in Histologically Normal Breast Epithelium Is Distinct from Loss of Heterozygosity or Allele Imbalance in Co-Existing Carcinomas. **Am J Pathol**, 161, 1, 283-290, 2002.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol Biol Evol**, 4, 203 – 221, 1987.

LOTHE, R.A. Microsatellite instability in human solid tumors. **Mol Med Today**, 61-68, 1997.

LUNDIN, C.; MERTENS, F. Cytogenetics of benign breast lesions. **Breast Cancer Res Treat**, 51, 1-15, 1998.

MAITRA, A.; WISTUBA, I. I.; WASHINTONG, C.; VIRMANI, A. K.; ASHFAQ, R.; MILCHGRUB, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss

of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. **Am J Pathol**, 159, 119-130, 2001.

MARTINEZ, A.; WALKER, R. A.; SHAW, J. A.; DEARING, S. J.; MAHER, E. R.; LATIF, F. Chromosome 3p allelic loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features, **J Clin Pathol: Mol Pathol**, 54, 300-306, 2001.

MCCULLOCH, R.K.; SELLNER, L. N.; PAPADIMITROU, J. M.; TURBETT, G. R. The incidence of microsatellite instability and loss of heterozygosity in fibroadenoma of the breast. **Breast Cancer Res Treat**, 49, 165-169, 1998.

MCDIVITT, R. W.; STEVENS, J. A.; LEE, N. C.; WINGO, P. A.; RUBIN, G. L.; GERSELL, D. Histologic types of benign breast disease and the risk for breast cancer. The Cancer, Steroid Hormone Study Group. **Cancer**, 69, 1408-1414, 1992.

MESIA-VELA, S.; SANCHEZ, R. I.; LI, J. J.; LI, S. A.; CONNEY, A. H.; KAUFFMAN, F. C. Catechol estrogen formation in liver microsomes from female ACI and Sprague-Dawley rats: comparison of 2- and 4-hydroxylation revisited. **Carcinogenesis**, 23, 8, 1369-1372, 2002.

MILANESE, T. R.; HARTMANN, L. C.; SELLERS, T. A.; FROST, M. H.; VIERKANT, R. A.; MALONEY, S. D.; PANKRATZ, V. S.; DEGNIM, M. C.; VACHON, C. N.; REYNOLDS, C. A.; THOMPSON, R. A.; MELTON III, L. J.; GOODE, E. L.; VISSCHER, D. W. Age-Related Lobular Involution and Risk of Breast Cancer. **J Natl Cancer Inst**, 98, 22, 1600-1607, 2006.

MILLER, B. J.; WANG, D.; KRAHE, R.; WRIGHT, F. A. Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions. **Am J Hum Genet**, 73, 748-67, 2003.

MOINFAR, F.; MAN, Y. G.; ARNOULD, L.; BRATTHAUER, G. L.; RATSCHEK, M.; TAVASSOLI, F. A. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. **Cancer Res**, 60, 2562-2566, 2000.

MUTI, P. The Role of Endogenous Hormones in the Etiology and Prevention of Breast Cancer: The Epidemiological Evidence. **RRCR**, 166, 245-256, 2005.

MIYAKIS, S.; SPANDIDOS, D.A.; Allelic loss in breast cancer. **Cancer Detection and Prevention**, 26, 6, 426-434, 2002.

NANDI, S.; GUZMAN, R. C.; YANG, J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92, 3650-3657, 1995.

NAVARRETE, M. A. H.; MAIER, C. N.; FALZONI, R.; QUADROS, L. G. A.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C.; NAZÁRIO, A. C. P. Assessment of the proliferative, apoptotic

and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Res**, 7, 306-313, 2005.

NAZÁRIO, A. C. P.; REGO, M. F.; OLIVEIRA, V. M. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, 29(4), 211-219, 2007.

NOGUCHI, S.; MOTOMURA, K.; INAJI, H.; IMAOKA, S.; KOYAMA, H. Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast. **Cancer Res**, 53, 4071-4074, 1993.

NOGUCHI, S.; YOKOUCHI, H.; AIHARA, T.; MOTOMURA, K.; INAJI, H.; IMAOKA, S.; KOYAMA, H. Progression of fibroadenoma to phyllodes tumour demonstrated by clonal analysis. **Cancer**, 76, 1779-1785, 1995.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, 194, 23-28, 1976.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C. J.; DEVILLE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol**, 63, 125-149, 2007.

OLIVEIRA, M.M.C. **Análise de perda de heterozigose no braço curto do cromossomo 3 (3p) em pacientes com carcinoma mamário esporádico**. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

OZZELLO, L.; GUMP, F. E. The management of patients with carcinomas in fibroadenomatous tumors of the breast. **Surg Gynecol Obstet**, 160, 99-104, 1985.

PEREZ-ORDÓÑEZ, B.; BEAUCHEMIN, M. and JORDAN, R.C.K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Pathol**, 59, 445-453, 2006.

PERUCHO, M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. **Biol Chem**, 377, 675-84, 1996.

REIS-FILHO, J. S.; LAKHANI, S. R. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: Genetic alterations in pre-invasive lesions. **Breast Cancer Res**, 5, 313-319, 2003.

RIED, T.; JUST, K. E.; HOLTGREVE-GREZ, H.; DU MANOIR, S.; SPEICHER, M. R.; SCHROCK, E.; LATHAM, C.; BLEGEN, H.; ZETTERBERG, A.; CREMER, T.; AUER, G. Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. **Cancer Res**. 55, 5415-5423, 1995.

ROYLANCE, R.; GORMAN, P.; HARRIS, W.; LIEBMANN, R.; BARNES, D.; HANBY, A.; SHEER, D. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by

histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. **Cancer Res.**, 59, 1433-1436, 1999.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Res**, 20, 211–215, 1992.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, 109, 365-371. 2000.

SHIVAKUMAR, L.; MINNA, J.; SAKAMAKI, T.; PESTELL, R.; WHITE, M.A. The RASF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. **Mol Cell Biol**, 22, 4309-4318, 2002.

SKLAIR-LEVY, M.; SELLA, T.; ALWEISS, T.; CRACIUN, I.; LIBSON, E.; MALLY, B. Incidence and Management of Complex Fibroadenomas. **Am J Roentgenol**, 190, 214 - 218, 2008.

SPEICHER, M.R. Microsatellite Instability in Human Cancer. **Oncol Res**, 7, 267-275, 1995.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOODMAN, D. S. The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine, **Annals of Internal Medicine**, 121, 78, 1994.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat Res**, 402, 7-14, 1998.

SUNDARESAN, V.; ROBERTS, I.; BATEMAN, A. The DUTT1 gene, a novel NCAM family member is expressed in developing murine neural tissues and has an unusually broad pattern of expression. **Molecular and Cellular Neurosciences**, 11, 29–35, 1998.

TAKEI, H.; IINO, Y.; HORIGUCHI, J., MAEMURA, M.; YOKOE, T.; KOIBUCHI, Y.; OYAMA, T.; OHWADA, S.; MORISHITA, Y. Natural History of Fibroadenomas Based on the Correlation Between Size and Patient Age. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, 29, 1, 8-10, 1999.

TERRY, G.; HO, L.; LONDESBOROUGH, P.; DUGGAN, C.; HANBY, A.; CUZICK, J. The expression of FHIT, PCNA and EGFR in benign and malignant breast lesions. **Br J Cancer**, 96, 1, 110-117, 2007.

THIAGALINGAM, S.; LAKEN, S.; WILLSON, J. K. V.; MARKOWITZ, S. D.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; LENGAUER, C. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98, 5, 2698–2702, 2001.

THIAGALINGAM, S.; FOY, R.L.; CHENG, K.; LEE, H.J.; THIAGALLINGAM, A.; PONTE, J.F. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: Molecular basis of its occurrence. **Current Opinion in Oncology**, 14, 65 -72, 2002.

THOMPSON, A.; BRENNAN, K.; COX, A.; GEE, J.; HARCOURT, D.; HARRIS, A.; HARVIE, M.; HOLEN, I.; HOWELL, A.; NICOLSON, R.; STEEL, M.; STREULI, C. Evaluation of the current knowledge limitations in breast cancer research: a gap analysis. **Breast Cancer Res**, 10, 26, 2008.

TIBILETTI, M. G.; SESSA, F.; BERNASCONI, B.; CERUTTI, R.; BROGGI, B.; FURLAN, D.; ACQUATI, F.; BIANCHI, M.; RUSSO, A.; CAPELLA, C.; TARAMELLI, R. A large 6q deletion is a common cytogenetic alteration in fibroadenomas, pre-malignant lesions, and carcinomas of the breast. **Clin Cancer Res**, 6, 1422-1431, 2000.

TOMLINSON, I.P.M.; LAMBROS, M.B.K.; ROYLANCE, R.R. Loss of Heterozygosity Analysis: Practically and Conceptually Flawed? **Genes, Chromosomes & Cancer**. 34, 349–353. 2002

TSE, G. M. K.; TAN, P. H. Recent advances in the pathology of fibroepithelial tumours of the breast. **Curr Diagn Pathol**, 11, 426-434, 2005.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, 7, 9, 659-72, 2007.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetics**, 9, 4, 138-141, 1993.

WANG, Z. C.; BURAIMOH, A.; IGLEHART, J. D.; RICHARDSON, A. L. Genome-wide analysis for loss of heterozygosity in primary and recurrent phyllodes tumor and fibroadenoma of breast using single nucleotide polymorphism arrays. **Breast Cancer Res Treat**, 97, 301-309, 2006.

WASHINGTON, C.; DALBÈGUE, F.; ABREO, F.; TAUBENBERGER, J. K.; LICHY, J. H. Loss of Heterozygosity in Fibrocystic Change of the Breast. Genetic Relationship Between Benign Proliferative Lesions and Associated Carcinomas. **Am J Pathol**, 157, 323-329, 2000.

WEAVER, D. L.; ROSENBERG, R.D.; BARLOW, W. E.; ICHIKAWA, L.; CARNEY, P. A.; KERLIKOWSKE, K.; BUIST, D. S. M.; GELLER, B. M.; KEY, C. R.; MAYGARDEN, S. J.; BALLARD-BARBASH, R. Pathologic Findings from the Breast Cancer Surveillance Consortium - Population-Based Outcomes in Women Undergoing Biopsy after Screening Mammography. **Cancer**, 106, 732-742, 2005.

WEINBERG, R. A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, 230, 770-776, 1985.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254, 1138-1145, 1991.

WILKINSON, S.; ANDERSON, T.J.; RIFKIND, E.; CHETTY, U. Fibroadenoma of the breast: a follow up of conservative management. **Br J Surg**, 76, 390–391, 1989.

WORSHAM, M. J.; ABRAMS, J.; RAJU, U.; KAPKE, A.; LU, M.; CHENG, J.; MOTT, D.; WOLMAN, S. R. Breast Cancer Incidence in a Cohort of Women with Benign

Breast Disease from a Multi-ethnic, Primary Health Care Population. **Breast J**, 13(2), 115-121, 2007.

YAMAMOTO, N.; KUROIWA, T.; KATAKURA, A.; SHIBAHARA, T.; CHOUDHURY, C. Loss of heterozygosity (LOH) on chromosomes 2q, 3p and 21q in Indian oral squamous cell carcinoma. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, 48, 3, 109-117, 2007.

YANG, A. KAGHAD, M. CAPUT, D. MCKEON F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. **Trends Genet**, 18, 90-95, 2002a.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SAKURAI, I.M.T.; KAKUDO, K. Chromosome 3p and breast cancer, **American journal of human genetics**. Vol. 47(9), p. 453- 459, 2002b.

ZABAROVSKY, E.R; LERMAN, M.I.; MINNA, J.D. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. **Oncogene**, 21, 6915-6935, 2002.

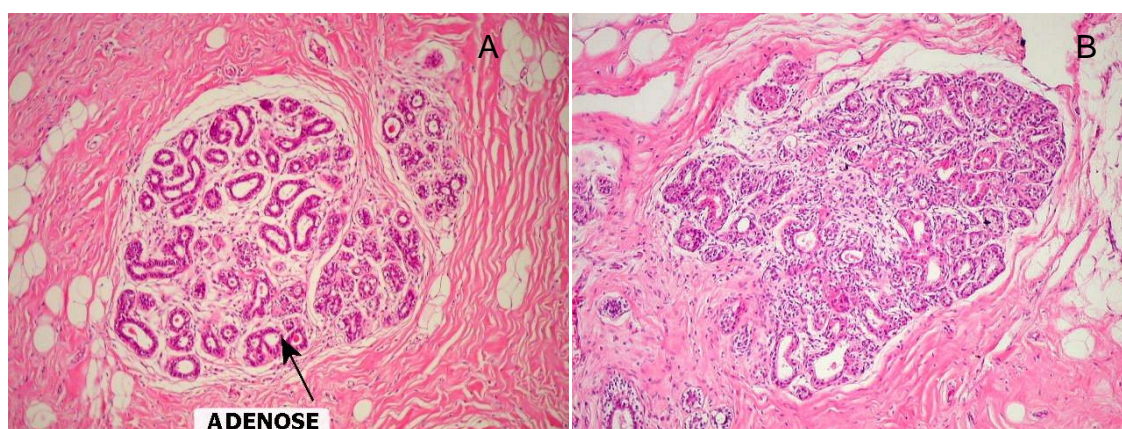


## GLOSSÁRIO

**Adenose Simples:** é uma lesão caracterizada por um aumento no número ou no tamanho dos componentes glandulares, principalmente envolvendo unidades lobulares. Ocorre o adensamento excessivo de pequenas glândulas em arranjo lobulocêntrico, com dilatação frequente daquelas mais periféricas, sem atipismos celulares ou desarranjo significativo da arquitetura ductolobular (Figura 7 – A).

**Adenose Esclerosante:** elevado número de elementos glandulares deformados e escleróticos, num arranjo lobulocêntrico, cobrindo uma área de pelo menos duas vezes o tamanho de uma unidade ductolobular normal. Constitui proliferação de elementos glandular e estromal resultando em um aumento e distorção de unidades lobulares. Ocorre, mais comumente, em cistos microscópicos múltiplos, contendo micro-calcificações difusas e, às vezes, se apresentam como massas palpáveis. Pode mimetizar lesões malignas, como o carcinoma infiltrante, podendo ser confundida com as mesmas ao exame físico, mamográfico e ao exame macroscópico anátomo-patológica (Figura 7 – B).

FIGURA 7 – Adenose Simples e Esclerosante



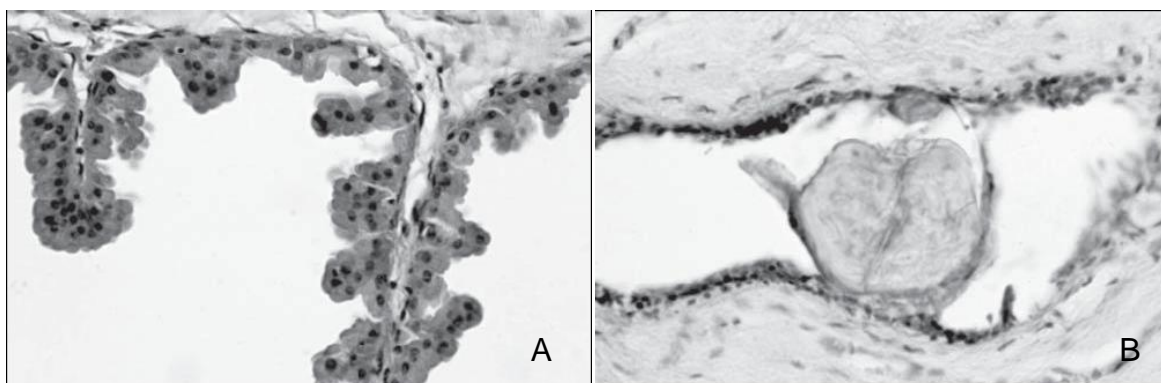
Fonte: Site de didático de anatomia patológica da Unicamp (<http://anatpat.unicamp.br/aulas2.html>)

**Alterações Papilares Apócrinas ou Metaplasia Apócrina:** projeções papilares de epitélio com características apócrinas para o lúmen do ducto. É caracterizada pela presença de células poligonais com citoplasma eosinófilo abundante e projeções citoplasmáticas luminiais (Figura 8 – A).

**Calcificação epitelial:** São alterações evidenciadas tanto em tecido mamário normal quanto em patológicos. Podem ser macro ou microscópicas. Encontram-se tanto no estroma como nos vasos sanguíneos. As microcalcificações difusas são encontradas nas adenoses esclerosantes (Figura 8 – B).



FIGURA 8 – Metaplasia Apócrina e Calcificação Epitelial



Fonte: CALADO e LIMA, 2004.

**Ectasia Ductal:** Processo que corresponde à dilatação de ductos principais e região subareolar. A ectasia ductal é devida a involução, quando os ductos subareolares maiores e intermediários se encurtam e dilatam, tornando-se ectáticos. Clinicamente são reconhecidos pela palpação de ductos dilatados preenchidos por epitélio ductal descamado e secreção proteinácea. É comum entre os 30-50 anos e está presente em cerca de 40% das mulheres com idade acima dos 70 anos. Seu grande significado clínico está na sua capacidade de mimetizar o carcinoma ductal invasivo.

**Fibrose Estromal:** Esta fase se caracteriza pela presença de tecido conjuntivo inter e intralobular muito denso, compacto, fibroso, colagenizado, comprimindo e distorcendo os ductos podendo levar à dilatação de algumas estruturas ductais, originando cistos. O epitélio dos ductos pode passar de simples cúbico a cilíndrico eosinofílico, caracterizando a metaplasia apócrina no revestimento ductal. Macroscopicamente, há pouco tecido adiposo. Há mais tecido homogêneo, esbranquiçado, firme, podendo ter cavitações císticas de diâmetros variáveis, geralmente preenchidas por líquido azulado. Microscopicamente, apresenta fibrose e colagenização em forma de placa ou nódulo. Formam-se cistos com epitélio atrófico.

**Hialinização:** alteração dentro da célula ou no espaço extracelular que dá um aspecto homogêneo, vítreo, rosado nos cortes histológicos. Geralmente ocorre com o processo de involução.

**Fontes:** CALADO e LIMA, 2004; GURAY e SAHIN (2006); CODD e GATELEY, (2007); Site de didático de anatomia patológica da Unicamp (<http://anatpat.unicamp.br/aulas2.html>)

## APÊNDICE

**APÊNDICE 01**    Tabela com dados clínicos e histopatológicos das pacientes .....    **88**

**APÊNDICE 02**    Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido.....    **92**

### APÊNDICE 01

**Tabela com dados clínicos e histopatológicos das pacientes**

<b>CÓDIGO</b>	<b>PATOLOGIA</b>	<b>Idade</b>	<b>Tamanho (mm)</b>	<b>Nódulos</b>
CP 011	FA	53	30	1
CP 021	FA	40	30	1
CP 031	FA	22	20	1
CP 051	FA, com HD complexa s/a	NL	25	1
CP 053	FA	17	25	1
CP 054	FA	31	20	1
CP 055	FA	19	20	1
CP 057	FA	28	20	2
CP 059	FA, com HD s/a	20	20	4
CP 062	FA	19	30	2
CP 063	FA, ectasia ductal, Ad, HE típica, fibrose estromal	31	18	1
CP 064	FA juvenil, com HE moderada típica e MA	17	30	4
CP 065	FA	46	15	1
CP 066	FA, estroma hialinizado	31	50	1
CP 071	FA juvenil	15	110	1
CP 075	D: FA, com MA; E:FA	NL	18	2
CP 078	FA	52	28	1
CP 081	FA	17	25	1
CP 088	FA	24	70	1
CP 092	FA	43	15	1
CP 116	FA Pericanalicular, com HD s/a e MA com componente epitelial	20	35	1
CP 122 A	FA hialinizado	21	35	2
CP 124	FA	32	30	1
CP 127	FA, com HE c/a	39	17	1
CP 131	FA	50	12	1
CP 132	FA	17	22	4
CP 133	FA	36	25	1
CP 135	FA	20	23	1
CP 137	FA	18	35	1
CP 138	FA	28	25	1
CP 140	FA pericanalicular, com MA e HD s/a; adj: Ad, ectasia ductal e MA	60	45	1
CP 146	FA	43	18	1
CP 163	FA peri e intracanalicular com HD s/a; Adj:HD c/a; fibrose estromal, ectasia ductal, MA, Ad e AdEs	44	12	1
CP 168	FA	21	20	1
CP 179	FA peri e intracanalicular com HD s/a; HP apócrina s/a, MA, hialinização, cistificação ductular	18	55	7
CP 181	FA pericanalicular com MA e HD s/a; adj: Ad e Ad	27	16	2

	tubular prolif, fibrose estroma e ectasia ductular			
CP 184	FA com MA, fibrose estromal, ectasia ductal e Ad	43	20	1
CP 200	FA	24	45	1
CP 201	FA pericanalicular com HD s/a; adj: mastopatia ã prolif.: fibrose estromal, ectasia ductal e MA	56	65	1
CP 211	FA com Ad	21	10	1
CP 215	FA com esclerose acentuada	56	15	1
CP 221	FA juvenil; adjacente: fibrose estromal	18	30	1
CP 222	FA, com HE s/a, cistificação e MA; adj: Ad, fibrose estromal e cistificação ductular	39	15	1
CP 232	FA	20	35	2
CP 233	FA, adj: fibrose estromal;	43	20	1
CP 234	FA	41	32	1
CP 235	FA	15	28	2
CP 236	FA, com cistificação ductular, MA cística e papilar, Fibrose estromal; Mastopatia proliferativa: Ad	20	15	1
CP 237	FA	20	25	1
CP 238	FA hialinizado	45	40	1
CP 242	FA	21	20	1
CP 244	FA	20	25	1
CP 245	FA hialinizado	33	32	2
CP 246	FA com MA	25	30	2
CP 249	FA	39	40	1
CP 250	FA	22	20	1
CP 251	FA, mastopatia proliferativa: Ad	16	30	1
CP 259 A e B	FA, HE	21	24	2
CP 261	FA	38	28	1
CP 262	FA	18	27	1
CP 263	FA	37	20	1
CP 265	FA	18	25	1
CP 272	FA	17	30	1
CP 274	FA com Ad e MA	31	30	2
CP 278	FA - recorrência Filodes Benigno	43	30	1
CP 279	FA Complexo; Alterações fibrocísticas: HD s/a, fibrose estromal, ectasia ductal, MA, Ad e AdEs	38	28	1
CP 280 A e B	A e B: cond. FA, complexa, MA e ectasia ductular; B: FA; Carcinoma intraductal padrao solido e comedo, focal (CDIS)	47	50	2
CP 284	FA	17	80	1
CP 285-A e B	FA hialinizado	20	55	2
CP 289	FA	22	20	2
CP 291	FA, com Ad e HE s/a	43	30	1
CP 292	FA	57	30	1
CP 294	FA Juvenil - recidiva em 2003	17	50	1
CP 301	FA com MA	35	20	4
CP 302	FA, Adj: mastopatia ã-prolif: fibrose estromal	23	25	1
CP 303	FA	20	30	1
CP 304	FA	26	25	1
CP 308	FA, alteração fibrocística: fibrose estromal, cistificação ductular e MA	39	35	2
CP 316	FA	18	30	1
CP 320	FA	25	32	1

CP 321	FA	16	25	1
CP 322	FA	42	20	1
CP 342	FA	NL	36	1
CP 345	FA Hialinizado	38	20	1
CP 346	FA	25	50	1
CP 347	FA	35	14	1
CP 352	FA	67	55	1
CP 355	FA	24	20	1
CP 357 D	D: FA com Ad; E: FA	20	40	2
CP 358	FA	51	52	1
CP 361	FA	36	20	1
CP 362	FA com hialinização estromal	39	30	1
CP 367	FA	24	65	1
CP 369	3 nódulos: 2 FA, 1 mastopatia ã prolif.: fibrose estromal,ecatasia ductal e MA	16	50	3
CP 370	FA	36	20	1
CP 374	FA	18	45	1
CP 375	FA	17	36	1
CP 377	FA	21	30	3
CP 378	FA	19	50	1
CP 381	FA com hialinização estromal	35	50	1
CP 387	FA	28	30	2
CP 393	FA	NL	35	NL
CP 395	FA	15	30	2
CP 398	FA com HD s/a	34	20	1
CP 403 D e E	D - FA; E- Hiperplasia fibradenomatosa e MA	23	30	2
CP 406	FA	19	30	3
CP 414	FA	26	41	1
CP 416	FA	24	35	1
CP 417 D e E	FA com fibrose estromal, MA e HE	34	30	3
CP 429	FA com MA e HE s/a	36	30	1
CP 431	FA	41	24	1
CP 435	FA	16	45	1
CP 437	FA	41	25	1
CP 442 A e B	A:FA com cistificação lobular, fibrose estromal, HE s/a e AdEs; B: Neurofibroma dérmico	NL	12	1
CP 447	FA	28	22	1
CP 449	FA	NL	30	1
CP 450	FA	36	45	1
CP 451 A e B	FA	20	25	2
CP 452	FA	20	40	1
CP 455	FA	18	30	1
CP 458	FA	41	28	1
CP 461 A e B	FA	40	25	2
CP 466	FA	NL	20	1
CP 468	FA	30	23	1
CP 469 D e E	FA	18	40	2
CP 472	FA	42	24	1
CP 473	FA adj: AdEs	41	35	1

CP 479 D e E	FA	31	20	2
CP 480	FA	NL	40	1
CP 481	FA	31	18	1
CP 483	FA	27	20	1
CP 490	FA	53	10	1
CP 512	FA	19	45	3
CP 514	FA	25	30	1
CP 516	FA	18	25	1
CP 552	FA	24	30	1
CP 554	FA	NL	NL	1
CP 580	Múltiplos nódulos: FA juvenil, MA, fibrose estromal, atipia epitelial plana, Ad, alterações secretoras, ectasia ductal, esclerose estromal.	38	85	21
CP 586	FA	NL	NL	NL
CP 601	FA	10	NL	NL
CP 614	FA, ectasia ductal, Hiperplasia Micropapilar Apócrina	38	100	múltiplos

Legenda: NL = informação ausente no laudo; HP = Hiperplasia Papilar; HD = Hiperplasia Ductal; HE = Hiperplasia Epitelial; MA = Metaplasia Apócrina; s/a = sem atipia; c/a = com atipia; Ad = adenose; AdEs = adenose esclerosante.

## APÊNDICE 2

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, \_\_\_\_\_, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli